

**ARGININ ABHÄNGIGE AKKUMULATION
PHENYLALANIN SPEZIFISCHER tRNA-ISOAKZEPTOREN
IN ESCHERICHIA COLI**

von
Hildburg Schellberger
aus
Berlin

1975 # 191

**ARGININ ABHÄNGIGE AKKUMULATION
PHENYLALANIN SPEZIFISCHER tRNA-ISOAKZEPTOREN
IN ESCHERICHIA COLI**

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Hildburg Schellberger

aus

Berlin

Als Dissertation genehmigt von den
Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 17. 2. 1975

Vorsitzender der Kommisarischen

Promotionskommission: Prof. Dr. H. Behrens

Erstberichterstatter: Prof. Dr. H. Kersten

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. W. Heumann

Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof. Dr. H. Kersten
- Arbeitsgruppe Biochemie -
Fachbereich Chemie/Biologie
an der Universität Erlangen - Nürnberg durchgeführt

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1.	Reagentien und Geräte	5
2.2.	Bakterienzüchtung	5
2.3.	Präparation der Transfer-Ribonucleinsäuren	5
2.4.	Präparation von Ribosomen und Enzym-Gemisch	8
2.5.	Protein-Bestimmung	9
2.6.	Säulenchromatographie	9
2.6.1.	BD-Cellulose	9
2.6.2.	"Reversed-Phase-Chromatography"	11
2.6.3.	DEAE-Sephadex	12
2.6.4.	DEAE-Cellulose	13
2.7.	Akzeptor-Aktivitäts-Test	13
2.8.	Protein-Synthese in vitro	16
2.9.	Ribosomenbindungstest	18
2.10.	Jod-Oxidation	20
3.	Ergebnisse	21
3.1.	Eigenheiten der verwendeten Bakterien-Stämme	21
3.1.1.	Arginin-Auxotrophie	21
3.1.2.	Bakterienzüchtungen zur Isolierung von tRNAs	22
3.1.3.	tRNA-Ausbeuten	23
3.2.	Chromatographisches Verhalten von tRNA ^{Phe}	24
3.2.1.	Wahl der Methode zur Trennung verschiedener tRNA-Species	24
3.2.2.	Trennung von phe-tRNA ^{Phe} aus E. coli an BD-Cellulose	26
3.2.3.	Trennung von phe-tRNA ^{Phe} aus E. coli RC ^{rel} arg ⁻ thi ⁻ - gezüchtet unter Arginin-Mangelbedingungen (BD-Cellulose)	28
3.2.4.	Trennung von phe-tRNA ^{Phe} aus E. coli RC ^{str} und RC ^{rel} arg ⁻ thi ⁻ - gezüchtet unter Arginin-Mangelbedingungen (RPC-5)	30
3.2.5.	Chromatographisches Verhalten von phe-tRNA ^{Phe} aus E. coli RC ^{str} und RC ^{rel} - gezüchtet bei optimaler Arginin-Konzentration (RPC-5)	34
3.2.6.	Bezeichnung verschiedener Typen von tRNA ^{Phe} auf Grund des Elutionsverhaltens an RPC-5-Säulen	34

3.3.	Arginin-bedingte Akkumulation von tRNA ^{Phe} Typ I	37
3.3.1.	E. coli RC ^{str}	38
3.3.2.	E. coli MRE 600	40
3.4.	Stoffwechselweg des Arginins in E. coli	42
3.5.	Chromatographisches Verhalten von leu-tRNA ^{Leu} und arg-tRNA ^{Arg}	44
3.5.1.	leu-tRNA ^{Leu} aus dem Wildtyp und den Mutanten von E. coli - gezüchtet bei verschiedenen Arginin-Konzentrationen	44
3.5.2.	arg-tRNA ^{Arg} aus E. coli MRE 600 und den Mutanten RC ^{str} und RC ^{rel} - gezüchtet bei verschiedenen Arginin-Konzentrationen	44
3.6.	Versuche zur Charakterisierung der verschiedenen Typen von tRNA ^{Phe}	46
3.6.1.	Ausschluß von Artefakten (Fehlbeladungen, Aggregation)	47
3.6.2.	Co-Chromatographien verschiedener tRNAs	49
3.6.2.1.	Co-Chromatographie von phe-tRNA ^{Phe} aus E. coli RC ^{rel} nach Arginin-Mangel und phe-tRNA ^{Phe} aus E. coli MRE 600	49
3.6.2.2.	Vergleich von phe-tRNA ^{Phe} aus E. coli RC ^{rel} nach Arginin-Mangel mit phe-tRNA ^{Phe} aus E. coli MRE 600 nach Chlörämpfenicol-Behandlung	51
3.7.	Chromatographisches Verhalten von phe-tRNA ^{Phe} Typ I und Typ II nach Oxidation mit Jod	51
3.7.1.	Oxidation modifizierter Basen	51
3.7.2.	Oxidation von tRNA ^{Phe} Typ I	56
3.7.3.	Oxidation von tRNA ^{Phe} Typ II	58
3.7.4.	Thiouridin-Gehalt der verschiedenen tRNAs	58
3.8.	Akzeptor-Aktivität	62
3.8.1.	Optimale Testbedingungen	62
3.8.2.	Acylierung von tRNA-Präparationen mit unterschiedlichem Verhältnis von tRNA ^{Phe} Typ I und Typ II	66
3.9.	Ribosomenbindung	70
3.9.1.	Optimale Ribosomen-Konzentration	70
3.9.2.	Optimale Polyuridylsäure-Konzentration	70
3.9.3.	¹⁴ C-phenylalanyl-tRNA-Konzentration	72
3.9.4.	Bindung von ¹⁴ C-phenylalanyl-tRNA an Ribosomen mit Poly U ₂ C	72
3.9.5.	Résumé der Optimierungsversuche	72
3.9.6.	"Codon Response" von tRNA ^{Phe} aus E. coli RC ^{rel} und aus E. coli RC ^{str}	73

3.10.	Protein-Biosynthese in vitro	76
3.10.1.	Optimale Testbedingungen	76
3.10.2.	Polyphenylalanin-Bildung von tRNA-Präparationen mit unterschiedlichem Verhältnis von tRNA ^{Phe} Typ I und Typ II	77
4.	Diskussion	79
5.	Zusammenfassung	85
	Literaturverzeichnis	87
	Anhang	

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A _{260nm}	Absorption bei 260nm
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Benzoyl-Diäthylaminoäthyl-
CAP	Chloramphenicol
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA spaltendes Enzym
GTP	Guanosintriphosphat
i ⁶ A	N ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl)-adenosin
ms ² -i ⁶ A	N ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl)-2-thiomethyl-adenosin
OD	Optische Dichte
phe-tRNA ^{Phe}	phenylalanyl-tRNA
Poly U	Polyuridylsäure
Poly U ₂ C	Polyuridyl-cytidyl-Säure mit einem Basenverhältnis von 2 : 1
PP ₁	anorganisches Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	RNA spaltendes Enzym
RPC	Reversed Phase Chromatography
s ⁴ U	Thiouridin
TCA	Trichloressigsäure
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
tRNA ^{Phe}	Phenylalanin-spezifische tRNA

1. Einleitung

Die Übersetzung des Basencodes der Messenger-RNA in die Aminosäuresequenz der Proteine erfolgt nicht durch direkte Wechselwirkung der Aminosäuren mit der mRNA. Die molekulare Verbindung zwischen der Aminosäure, die erst einem Aktivierungsprozeß unterzogen wird, und der mRNA wird von den Transfer-Ribonukleinsäuren hergestellt. Für jede Aminosäure existiert wenigstens eine spezifische tRNA - meistens aber mehrere. Für die biologische Funktion der tRNAs ist ihre Konformation von großer Bedeutung. Es bestehen zahlreiche Modellvorstellungen für eine Tertiärstruktur der tRNAs. Sie lassen sich alle auf das ursprüngliche Kleeblatt-Modell von Holley et al. (1965) zurückführen. In diesem Modell werden vier doppelsträngige Abschnitte, die je vier bis sechs Basenpaare enthalten, angenommen (siehe Beispiel von tRNA^{Phe} im Anhang 1). Am Stamm trägt es die freie 3'-terminale Hydroxylgruppe, die zur Bindung der Aminosäure bei der Biosynthese der Proteine dient. In der Schleife am entgegengesetzten Ende ist die Trinukleotidsequenz exponiert, die als "Anticodon" die komplementäre Sequenz für das Code-Triplett der Messenger-RNA darstellt.

Eine der charakteristischsten Eigenschaften von Transfer-Ribonukleinsäuren ist ihr Gehalt an seltenen Komponenten ("minor components"). Primär enthalten alle tRNAs nur die vier Nukleoside: Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin. Nach der Transcription wird ein gewisser Prozentsatz der Nukleoside in enzymatisch katalysierten Prozessen auf der Polynukleotidstufe modifiziert (Fleissner und Borek, 1962, Hurwitz, Gold und Anders, 1964, Lipsett und Peterkofsky, 1966, Weiss und Legault-Demare, 1965, Hayward und Weiss, 1966). Die Modifizierung kann sehr einfach sein: Methylierte und sulfhydrierte Nukleoside wurden gefunden, weiterhin

hydrierte Basen, das ungewöhnliche Nucleosid Pseudo-uridin und sogar das sonst nur in DNA vorkommende Thymin als Thyminribosid. Besteht die Modifikation darin, daß dem Nucleosid längere Seitenketten angefügt werden, spricht man von hypermodifizierten Basen.

Sechs verschiedene hypermodifizierte Nucleoside wurden bisher identifiziert: $N^6-(\Delta^2\text{-isopentenyl-})$ adenosin, $N^6-(\Delta^2\text{-isopentenyl-})$ -2-methyl-thioadenosin, $N^6-(\text{cis-4-hydroxi-3-methyl-but-2-ethyl-})$ adenosin, N-(nebularin-6-ylcarbamoyl)-L-threonin, 5-Carboxi-methyl-uridin, Methyl,2-thio-5-carboxymethyluridin (Formeln siehe Anhang 2).

Die in den tRNAs von *Escherichia coli* am häufigsten vorkommenden Modifikationen sind verschiedene methylierte Basen, Pseudouridin (Amos und Korn, 1958, Littlefield und Dunn, 1958, Dunn, Smith and Spahr, 1960), 4-Thiouridin (Lipsett, 1965) und als hypermodifiziertes Nucleosid $N^6-(\Delta^2\text{-isopentenyl-})$ -2-thio-methyl-adenosin (Barrell and Sanger, 1969), ein Nucleosid, das zweifach modifiziert ist.

Über die Art und Spezifität der modifizierenden Enzyme ist noch sehr wenig bekannt. Wird die Proteinsynthese und damit auch die Synthese der modifizierenden Enzyme gehemmt, indem dem Nährmedium der Bakterien geeignete Hemmstoffe wie Chloramphenicol oder Pactamycin zugesetzt werden, zeigt das isolierte tRNA-Gesamtgemisch einen gewissen Prozentsatz an untermodifizierten Nucleosiden, der in den Kontrollen im allgemeinen nicht gefunden wird. Ein tRNA-Gemisch, das aus mit Pactamycin behandelten Keimen von *B. subtilis* isoliert wird, nimmt bei der Methylierung in vitro viermal soviel Methylgruppen auf wie die korrespondierende RNA der unbehandelten Kontrolle (H. Kersten et al., 1968).

Chloramphenicol und Pactamycin gehören wie die Tetracycline, Puromycin und Erythromycin zu der Gruppe von

Antibiotika, die die Proteinsynthese hemmen auf Grund von Wechselwirkung des Antibiotikums mit den Ribosomen. Die DNA Transkription wird durch das Antibiotikum nicht beeinflusst, so daß es zur Anhäufung von RNA in der Zelle kommt.

In Mikroorganismen ist die Proteinsynthese mit der RNA-Synthese gekoppelt. Das bedeutet, daß eine Verminderung der Proteinsyntheserate mit einer Verminderung der RNA-Syntheserate einhergeht. Diese strenge Kontrolle (stringent control, rel^+) kann, wie oben beschrieben, durch Hemmstoffe der Proteinbiosynthese oder durch Mutation aufgehoben werden. Die verminderte Proteinsyntheserate in sogenannten "relaxed" oder rel^- Mutanten ist nicht mehr begleitet von einer Hemmung der RNA-Synthese (Borek et al., 1955). Weitere Mutationen, die sowohl für den Wildtyp mit dem rel^+ Gen als auch für die Mutante mit dem rel^- Gen gefunden wurden, sind Auxotrophie(n) für eine oder mehrere Aminosäure(n). Die Wachstumsrate einer solchen Mutante hängt dann von der Konzentration der essentiellen Aminosäure im Nährmedium ab. Der Entzug der essentiellen Aminosäure führt zur Hemmung der Proteinsynthese. Wird für die Untersuchungen die Mutante mit dem defekten rel^- Gen verwandt und diese in Nährmedien mit limitierendem Aminosäuregehalt gezüchtet, so hört nach Verbrauch der Aminosäure die Proteinsynthese auf, die Transkription geht weiter. Ähnlich wie Aminosäuremangel in den rel^- Mutanten, heben Inhibitoren der Proteinsynthese in rel^+ Stämmen die strenge Kontrolle auf. Die Synthese der tRNAs umfaßt Transkription, Modifikation und "Processing". Während bei gehemmter Proteinsynthese durch die Inhibition die Transkription unverändert bleibt, sind Modifikation und Processing unvollständig (Waters, 1969, Kersten et al., 1968, Mann und Huang, 1973).

Der unterschiedliche Modifikationsgrad im Molekül einer spezifischen tRNA kann zur Veränderung des chromatographischen Verhaltens der tRNA führen (Peterkofsky, 1968),

so daß sogenannte isoakzeptierende tRNAs auftreten. Als Isoakzeptoren wurden ursprünglich solche tRNAs bezeichnet, die zwar dieselbe Aminosäure akzeptieren, sich aber chromatographisch voneinander trennen lassen. Die Ursache für ein unterschiedliches chromatographisches Verhalten kann eine veränderte Basensequenz sein. Diese würde für eine spezifische tRNA dann auftreten, wenn verschiedene Gene für die isoakzeptierenden tRNAs codieren (heterogenetische Isoakzeptoren). Weitere Ursachen für unterschiedliches Verhalten im Chromatogramm könnten Veränderungen in den modifizierten Basen einer tRNA sein (isogenetische Isoakzeptoren).

Von Waters (1969) sowie von Mann und Huang (1973) wurde gezeigt, daß sich in *Escherichia coli* nach Behandlung mit Chloramphenicol das Verhältnis der isoakzeptierenden Species für Phenylalanin-spezifische tRNAs ändert. Dieselben Beobachtungen machten Kersten et al. (1968) an *B. subtilis* nach Behandlung mit Pactamycin.

Damit ergab sich die Frage, ob die Aufhebung der strengen Kontrolle zwischen RNA- und Proteinsynthese zu Veränderungen im Muster isoakzeptierender tRNAs führt.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die Aufhebung der strengen Kontrolle in *E. coli* RC^{rel} durch Aminosäure-Mangel analoge Veränderungen im Muster von tRNA-Isoakzeptoren hervorruft wie die Aufhebung der strengen Kontrolle in *E. coli* RC^{str} nach Behandlung mit Ribosomen-Inhibitoren.

Es sollte versucht werden zu klären, ob es sich um heterogenetische oder isogenetische tRNA-Isoakzeptoren handelt.

2. Material und Methoden

2.1. Reagentien und Geräte

Die Reagentien wurden von folgenden Quellen bezogen: BD-Cellulose, Fa. Schwarz; DEAE-Sephadex A-50 von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden; DEAE-Cellulose von Whatman, England; Résines Voltalef 300 LD-PL micro von Ugine Culman, Frankreich, gekauft bei Lehmann & Voss, Hamburg, BRD; Adogen 464 von Ashland Chemicals Co, Columbia, USA; Milliporefilter von Millipore Filter-Corp, poly-U von Mile, England und poly-UUC von Boehringer, Mannheim, BRD. Alle anderen benutzten Chemikalien waren Reagentien von der Firma Merck, Darmstadt, BRD, mit dem Reinheitsgrad "pro analysi". Radioaktive Verbindungen (^3H - und ^{14}C -Aminosäuren und ^{14}C -S-adenosyl-methionin (SAM) wurden kommerziell erworben von Radiochemical Centre, Amersham, mit spezifischen Aktivitäten, wie sie an entsprechender Stelle angegeben sind.

Die Fraktionen der Säulenchromatographien wurden mit einem Fraktionssammler der Firma LKB-Produkter AB, Brommer, Schweden, in einer Kühltruhe der Firma Colora gesammelt, die UV-Absorptionen der Eluate der Säulenchromatographien wurden mit einem Uvicord 3 oder 2 der Firma LKB-Produkter AB gemessen und mit einem Schreiber der gleichen Firma automatisch registriert. Die Radioaktivitäten wurden in einem Flüssigkeitsscintillationszähler der Firma Packard (Modelle 3320 und 3375) ermittelt.

2.2. Bakterienzüchtung

Für die Untersuchungen dieser Studie wurden Bakterien des Stammes E. coli K 12 (PA 2) RC^{str} und (PA 1) RC^{rel} , die beide auxotroph für Arginin und Thiamin sind, verwendet. Die Auxotrophie für Thiamin ist nur gering ausgeprägt bei diesen Mutanten.

Die Bakterien wurden in einem Minimalsalzmedium gezüchtet, das pro Liter folgende Substanzen enthielt:
2,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,5 g KH_2PO_4 , 5,0 g NaCl, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 3,0 g Natriumglutaminat und 5,0 g Glukose, pH 7,4 und mit Thiamin und Arginin oder einem Gemisch von allen Aminosäuren - aber ohne Arginin - supplementiert. Die genauen Konzentrationsangaben werden jeweils im Text gegeben.

Die Bakterien wurden in einem 20-Liter-Fermenter der Firma Eschweiler, Kiel, gezüchtet und 4 Stunden nach Erreichen der stationären Phase mit einer Cepa-Durchlaufzentrifuge geerntet. Bis zur Aufarbeitung wurden die Bakterien in einer Tiefkühltruhe bei -35°C aufbewahrt.

2.3. Präparation der Transfer-Ribonucleinsäuren

Für die Isolierung der Gesamtnucleinsäuren wurden die Bakterienzellen mit Phenol nach der Methode von Avital und Elson (1969) extrahiert. 10 g Bakterien wurden in 30 ml eines Puffers nach Nirenberg und Matthaei (1961) (1×10^{-2} M Tris-HCl, pH 7,4, 1×10^{-2} M Magnesiumacetat und 6×10^{-3} M 2-Mercaptoethanol) suspendiert, dann wurden 30 ml frisch-destilliertes Phenol, das mit demselben Puffer bei 20°C gesättigt wurde, hinzugefügt. Nach 30-minütigem gleichmäßigen Rühren mittels eines Magnetrührers wurde 1 ml Chloroform hinzugefügt und weitere 15 Minuten gerührt. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 23 000 g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Alle Arbeiten wurden in einem Kühlraum bei $+4^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die obere wäßrige Phase wurde solange mit puffergesättigtem Phenol reextrahiert, bis keine Proteinschicht mehr zwischen den beiden Phasen sichtbar war. Aus den vereinigten wäßrigen Phasen wurde das Phenol mit Äther entfernt, der wiederum mit Hilfe eines Luftstromes aus der Flüssigkeit getrieben wurde. Jetzt wurde die Lösung, die die Nucleinsäuren enthielt, wenigstens für 2 Stunden bei 23 000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die

Nucleinsäuren mit 2,5-fachem Volumen Aethanol/
2% Kaliumacetat präzipitiert. Um eine maximale Ausfällung
zu erreichen, wurde das Präzipitat wenigstens für 12
Stunden bei -20°C aufbewahrt.

Zur Reindarstellung biologisch-aktiver tRNAs wurde das
Nucleinsäurengemisch an eine DEAE-Sephadex-50-Säule nach
der Methode von Nishimura und Weinstein (1969) chroma-
tographiert und so von DNA, 5S-RNA und anderen Verunrei-
nigungen befreit. Auf eine Säule von 80 cm Länge und einem
Querschnitt von 1 cm wurden höchstens $3000 - 4000 A_{260\text{nm}}$
Einheiten des Gemisches aufgegeben. Vor der Säulenchroma-
tographie wurde das DEAE-Sephadex-Ionenaustauschmaterial
mit Puffer I aequilibriert. Das Präzipitat der Alkohol-
fällung wurde in Puffer I aufgenommen, auf die Säule gege-
ben und mit 600 ml eines linearen Gradienten, der zu glei-
chen Teilen aus Puffer I und Puffer II bestand, eluiert.
Die genannten Puffer enthalten:

Puffer I 0,375 M NaCl,
 1×10^{-2} M MgCl_2 ,
 2×10^{-2} M Tris-HCl, pH 7,5

Puffer II 0,525 M NaCl,
 1×10^{-2} M MgCl_2 ,
 2×10^{-2} M Tris-HCl, pH 7,5

Die Durchflußrate betrug ca. 10 ml pro Stunde, es wurden
jeweils 40-Minuten-Faktionen gesammelt. Die Wiederge-
winnung der tRNA aus den Faktionen erfolgte, indem die
tRNA-enhaltenden Faktionen vereinigt und am Rotations-
verdampfer bis zur Salzsättigung konzentriert wurden.
Zur Entfernung des Salzes wurde für 12 Stunden gegen bi-
destilliertes Wasser (vier Liter) dialysiert und anschlie-
ßend mit dem 2,5-fachen Volumen Aethanol/2% Kaliumacetat
gefällt. Die abzentrifugierte tRNA wurde in 2 - 3 ml
2n Tris-Acetate, pH 8,2 aufgenommen und für 90 Minuten
bei 37°C desacyliert; danach wurde das Tris-Acetate durch
Dialyse ($2 \times 1^{\text{h}}$ gegen 2 l bidest. H_2O) entfernt und die

tRNA in beschriebener Art gefällt. Es wurde eine hochgereinigte tRNA erhalten, wie die Untersuchung in einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zeigte. Die biologische Aktivität der tRNA wurde im Akzeptor-Aktivitäts-Test geprüft.

2.4. Präparation von Ribosomen und Enzymgemisch

Für die Ribosomenpräparation wurden Bakterien des Stammes E. coli MRE 600 verwendet. Diese Keime wurden in einem Minimalmedium gezüchtet und bei Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Ribosomenpräparationen dieses Wachstumsstadiums besaßen die größte biologische Aktivität. 10 g Bakterien wurden mit 20 g Alcoa A 305 für 5 Minuten bei 5°C in einem Mörser aufgeschlossen. Die Bakterien-Alcoa-Paste wurde in zwei Stufen mit einem Gesamtvolumen von 20 ml Puffer III extrahiert.

Puffer III	1 x 10 ⁻² M Tris-HCl, pH 7,4,
	6 x 10 ⁻² M KCl,
	1 x 10 ⁻² M Mg(OAc) ₂ ,
	6 x 10 ⁻² M 2-Mercaptoethanol,
	0,1 mg DNase I/100 ml

Die unlöslichen Zelltrümmer wurden durch dreimaliges Zentrifugieren bei 30 000 g einmal für 10 Minuten und zweimal für 20 Minuten entfernt. Nach jeder Zentrifugation wurde das Sediment verworfen. Die vereinigten Überstände wurden durch eine Zentrifugation bei 100 000 g für 2 Stunden weiter gereinigt. Nach dieser Zentrifugation wurden die oberen zwei Drittel des Überstandes in Portionen zu 0,1 ml eingeteilt und eingefroren. Das andere Drittel des Überstandes wurde verworfen. Das verbliebene Sediment, das die Ribosomen enthielt, wurde in 5 ml Puffer III suspendiert. Zentrifugengläser wurden zu gleichen Teilen mit einem "High-Speed-Sucrose-Buffer" und der Ribosomensuspension gefüllt, wobei die Ribosomen sorgfältig auf den Saccharose(sucrose)-Puffer aufgegeben wurden. Die bis oben-

hin gefüllten und geschlossenen Zentrifugengläser wurden für 14 - 16 Stunden bei 150 000 g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Saccharose-Puffer enthielt pro 100 ml

Saccharose-Puffer	37,65 g RNasefreie Saccharose,
	0,25 g Tris-HCl, pH 7,8 bei 4°C,
	2,7 g NH ₄ Cl,
	0,22 g MgAc ₂ ,
	0,015 g EDTA.

Das Ribosomensediment wurde in einem kleinen Volumen-Puffer suspendiert und portionsweise bei -63°C eingefroren. Die biologische Aktivität der Ribosomen wurde in einem zellfreien proteinsynthetisierenden System geprüft.

2.5. Proteinbestimmung

Die Aminoacyl-Synthetase-Aktivitäten der Enzymüberstände, die durch Zellfraktionierung gewonnen wurden, schwankten von Präparation zu Präparation sehr. Die Aktivitäten wurden im Akzeptor-Aktivitäts-Test bestimmt (2.7.) und auf mg Protein pro ml Überstand bezogen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der bekannten Mikrobiuretmethode von Baoley (1967).

2.6. Säulenchromatographie

2.6.1. BD-Cellulose

Die Gesamt-tRNA wurde an BD-Cellulose nach der Methode von Gillam und Tener (1971) getrennt. Die kommerziell erworbene, fast trockene BD-Cellulose wurde in einem ausreichenden Volumen 2,0 M NaCl in 10 mM Essigsäure, 10 mM MgCl₂-Lösung, pH 4,5 (mit NaOH eingestellt), die 20% Alkohol enthielt, aufgeschwemmt. Nach 15-minütigem Rühren wurde der Alkohol mit der sonst gleichen alkoholfreien Lösung ausgewaschen. Die BD-Cellulose darf nicht längere Zeit in der 20%igen Lösung verbleiben, weil sie dann ihre Benzoylgrup-

pen verliert! Das so für die Chromatographie vorbereitete Material wurde in einem geschlossenen Gefäß mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe von Luft befreit, indem diese ca. 30 Minuten lang abgezogen wurde. Alle benötigten Puffer wurden auf die gleiche Art und Weise von Luft befreit.

Die Säule wurde von unten zu dreiviertel mit 2,0 M NaCl-Puffer (s.o.) gefüllt. Die Cellulose wurde als 5%ige Suspension von oben vorsichtig, ohne daß Luftblasen entstanden, eingefüllt. Nachdem sich ca. 1 cm BD-Cellulose-Material abgelagert hatte - es ist möglich, diese Ablagerung etwas zu beschleunigen, indem ein Glasstab zweibis dreimal sehr schnell an der Säulenwand von oben nach unten geführt wird (Vorsicht vor Luftblasen) -, wurde die Säule mit der Geschwindigkeit gefüllt, die der späteren Durchflußrate entsprach. Das Absetzen von "Stufen" ist unbedingt zu vermeiden! Das Säulenbett betrug 1 x 80 cm.

Nach der Füllung wurde noch zwölf Stunden lang mit dem 2,0 M NaCl-Puffer nachgewaschen, weil sich in dieser Zeit die Säulenfüllung noch dichter packte. Anschließend wurde die Säule mit dem gleichen Puffer, der 0,3 M NaCl enthielt, aequilibriert.

Für die chromatographische Trennung wurde mit Alkohol gefällte und mit Luft getrocknete tRNA in wenig Aequilibrierungspuffer aufgenommen. Nach dem Eindringen der tRNA-Lösung in das Säulenbett wurde die Säule für sieben Stunden mit demselben Puffer gewaschen.

Die Auftrennung in einzelne spezifische tRNAs erfolgte

1. mit einem linearen Salzgradienten bestehend aus je 250 ml

Puffer IV 0,3 M NaCl,
 10 mM Essigsäure,
 10 mM $MgCl_2$, pH 4,5 (eingestellt mit NaOH)
 und

Puffer V 1,0 M NaCl,
 10 mM Essigsäure,
 10 mM MgCl_2 , pH 4,5,

2. mit einem linearen Alkoholgradienten bestehend aus je 200 ml

Puffer V siehe oben

Puffer VI 1,2 M NaCl
 10 mM Essigsäure,
 10 mM MgCl_2 ,
 9,5% reiner, für die Spektroskopie geeigneter Alkohol, pH 4,5.

Es wurden 1,2 ml Fraktionen gesammelt, die Durchflußrate betrug 11 ml/Stunde.

Nach der Auftrennung des tRNA-Gemisches wurde die BD-Cellulose aus der Säule genommen, in 20% Alkohol enthaltenden 2,0 M NaCl-Puffer (s.o.) aufgenommen, gewaschen und zum erneuten Gebrauch wie oben beschrieben behandelt.

2.6.2. "Reversed - Phase - Chromatography"

Die reversed-phase-chromatography wurde nach dem RPC-5-System, das von Pearson et al. (1971) beschrieben wird, durchgeführt.

4 ml des Austauschers Adogen 464 wurden in 200 ml Chloroform gelöst und auf 100 g des Trägermaterials Résines Voltalef aufgebracht, indem beides in einer offenen Glaschale solange miteinander verrührt wurde, bis das Chloroform völlig entwichen war.

Das trockene Austauschermaterial wurde in

Puffer VII 2,0 M NaCl,
 10 mM MgAc_2 ,
 10 mM NaAc, pH 5,0

aufgenommen und in eine auf 25°C temperierte Säule (Säulenbett 1,0 x 80 cm), die vorher mit demselben Puffer

gefüllt wurde, gebracht. Die Säule wurde mit der Geschwindigkeit gefüllt, die der späteren Durchflußrate entsprach. Für 6 - 8 Stunden wurde sie mit oben genanntem Puffer gewaschen und anschließend mit Puffer VIII aequilibriert. Die Gesamt-tRNA wurde chromatographisch mit einem linearen Salzgradienten bestehend aus je 500 ml

Puffer VIII 0,45 M NaCl ,
 10 mM MgAc₂,
 10 mM NaAc , pH 4,5 und

Puffer IX 1,0 M NaCl ,
 10 mM MgAc₂,
 10 mM NaAc , pH 4,5

getrennt. Die Durchflußrate betrug 56 ml/h. 6-Minutenfraktionen wurden gesammelt.

2.6.3. DEAE-Sephadex

Die säulenchromatographische Trennung mit dem DEAE-Sephadex-Material wurde zur Reinigung der isolierten tRNAs verwendet und ist unter Punkt 2.3. beschrieben.

Vor Gebrauch wurde der Ionenaustauscher "aktiviert", indem ca. 15 g in zwei Liter Wasser aufgenommen und für eine Stunde darin zum Quellen gebracht wurden. Danach folgte Waschen des Ionenaustauschers in der angegebenen Reihenfolge mit nachstehenden Lösungen:

0,1 M H₃PO₄ - dest. Wasser - 0,5 M NaOH - dest. Wasser.

Das Waschen mit destilliertem Wasser wurde jedesmal so lange fortgesetzt, bis der pH des dekantierten Überstandes mit dem pH des destillierten Wassers übereinstimmte.

Gebrauchtes DEAE-Sephadex wurde mit einem 1,0 M NaCl enthaltenden Puffer (siehe Elutionspuffer) gewaschen und dann der beschriebenen Aktivierungsprozedur unterzogen.

2.6.4. DEAE-Cellulose

DEAE-Cellulose wurde sowohl zur Wiedergewinnung von tRNA aus dem Acylierungsansatz verwendet (wird unter Punkt 2.7. beschrieben) als auch zur Entfernung der unerwünschten Transfer-Ribonucleinsäuren in den S-100-Fractionen. Zu diesem Zweck wurde die DEAE-Cellulose in

Puffer X 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5,
 6×10^{-3} M Mercaptoaethanol
 (Ehrenstein und Dais 1963)

aufgenommen und in eine Säule von 1 x 10 cm gefüllt. Der S-100-Überstand (siehe 2.4.) wurde auf die Säule gegeben. Das Enzymgemisch wird nicht von der DEAE-Cellulose gebunden und verläßt die Säule sofort wieder. Die tRNAs dagegen verbleiben in der Säule. Die Säule wurde so lange mit demselben Puffer nachgewaschen, bis alles Protein die Säule verlassen hatte. Nur die konzentrierten Fraktionen wurden verwendet.

Die Vorbereitung der DEAE-Cellulose erfolgte, indem eine entsprechende Menge Substanz durch Dekantieren dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen wurde. Hierauf folgte Waschen mit nachstehenden Lösungen:

0,5 M NaOH - dest. Wasser - $0,3 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ - dest. Wasser -
0,5 M NaOH - dest. Wasser.

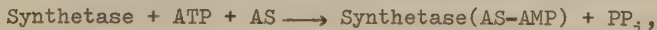
Das Waschen mit destilliertem Wasser wurde jedesmal so lange fortgesetzt, bis der pH-Wert des dekantierten Wassers mit dem pH des destillierten Wassers übereinstimmte. Gebrauchtes Material wurde verworfen.

2.7. Akzeptor-Aktivitäts-Test

Prinzip: Isolierte Transfer-Ribonucleinsäuren sind befähigt, in einem geeigneten Puffersystem in Anwesenheit der spezifischen aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit der Carboxylgruppe aktivierter Aminosäuren an der 2' oder 3' Hydroxylgruppe ihres terminalen Adenosins zu verestern. Die

aminoacyl-tRNA-Synthetasen, von denen je eine für nur eine Aminosäure spezifisch ist, katalysiert zwei Reaktionen:

1. Die Aktivierung der Aminosäure in der Reaktion



2. die Veresterung der aktivierten AS mit der tRNA, die an einer benachbarten Enzymstelle gebunden ist



Ist im Reaktionsansatz genügend Energie in Form von ATP und eine geeignete Enzymmenge vorhanden, wird eine markierte Aminosäure optimal mit ihrer tRNA verestert. Meßgröße für die biologische Aktivität einer tRNA-Population ist die spezifische Aktivität ($\text{pMol AS/A}_{260\text{nm}} \text{ tRNA}$), die sich aus der radioaktiven Messung berechnen läßt.

Testansatz: Jeder 250 μl Testansatz enthält

- 100 mM Tris-HCl, pH 7,2,
- 16 mM MgAc₂,
- 10 mM KCl,
- 6 mM Mercaptoaethanol,
- 0,50 μM ATP,
- 2 - 3 $\text{A}_{260\text{nm}}$ Gesamt-tRNA,
- 5 nM ¹⁴C- oder ³H-markierte Aminosäure,
- ca. 15 μg S-100.

Durchführung: Der Acylierungsansatz wurde in Anlehnung an Feldmann et al. (1971) und Emmerich et al. (1972) durchgeführt. Die Reaktion wurde mit dem Enzym gestartet. Für Endpunktacylierungen wurde für 30 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Zur Bestimmung der Menge veresterter Aminosäure wurden 50 μl des Ansatzes gemäß der Methode von Mans und Novelli (1960) auf ein Papierfilter gegeben und die tRNA in 10%iger, gekühlter TCA präzipitiert. Die Filter wurden je zweimal mit 5%iger TCA und anschließend mit einem Gemisch aus Aether und Alkohol im Verhältnis 1 : 1 gewaschen und getrocknet. Die getrockneten Filterpapiere wurden in ein Scintillationsgefäß, das 6 ml Scintillations-

flüssigkeit enthielt (3 g Diphenyloxazol und 0,3 g 1,4-Bis-(2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl))-Benzol/l in Toluol, überführt und die Radioaktivität gezählt.

Die spezifische Aktivität der Transfer-Ribonucleinsäuren wird in pMol/A_{260} angegeben und wurde nach der Beziehung

$$\frac{\text{pMol acyl. AS}}{A_{260\text{nm}}} = \frac{\text{Radioaktivität im Ansatz X gezählte cpm}/A_{260}}{\text{verw. spezif. Radioaktivität X Faktor}}$$

errechnet.

Der Faktor ergibt sich aus der Zählausbeute des Scintillationszählers unter Berücksichtigung der verwendeten Methode, z.B. ergeben 1 $\mu\text{C } ^{14}\text{C}$ bei einer Zählausbeute von 70% 155×10^5 cpm. In der Gleichung müssen für den Faktor cpm eingesetzt werden, um pMol zu erhalten; Radioaktivität im Ansatz und verwendete spezifische Radioaktivität werden in $\mu\text{C}/\text{pMol}$ eingesetzt.

Für die präparative Aminoacylierung wurde der Ansatz entsprechend der benötigten tRNA-Menge vergrößert. Die tRNA wurde aus dem Inkubationsansatz wiedergewonnen, indem

entweder: dem Ansatz ein gleiches Volumen mit Wasser gesättigten Phenols zugesetzt wurde, das nach 10-minütigem Rühren bei 4°C durch Zentrifugation abgetrennt und mit Äther restlich entfernt wurde; die tRNA wird aus der verbleibenden wäßrigen Phase mit Äthanol/2% Kaliumacetat bei -20°C für mindestens 4 Stunden gefällt

oder: der Ansatz nach der Methode von Yang und Novelli (1968) säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose (Whatman DE 32, 1 x 3 cm) gereinigt wurde. Die Säule wird mit einem Puffer, der 0,25 M NaCl, 0,01 M MgAc_2 und 0,001 M EDTA, pH 4,8 enthält, aequilibriert, mit dem Reaktionsansatz, der vorher mit demselben Puffer im Verhältnis 1 : 1 verdünnt wurde, beladen und mit 30 - 40 ml

Puffer gewaschen. Schließlich wird die tRNA mit ca. 3 ml eines gleichen Puffers, der aber 1 M NaCl enthielt, eluiert.

2.8. Proteinsynthese in vitro

Prinzip: Zellfreie Proteinsynthese ist dann möglich, wenn alle am Translationsprozeß beteiligten Zellbestandteile isoliert werden. In einem Puffersystem, das genügend Energie zur Verfügung stellt und mit ausreichenden Mengen Aminosäuren supplementiert ist, reagieren die Zellbausteine. Der Mechanismus der Proteinsynthese kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abgehandelt werden und ist in entsprechenden Lehr- und Fachbüchern zu erfahren, z.B. in "The Ribonucleic Acids" (Stewart and Letham, 1973). Der Translationsprozeß kann in folgende drei Stufen eingeteilt werden, denen folgende Aufgaben unter Verwendung der genannten Komponenten zukommen:

1. Initiation - Bildung des Initiationskomplexes aus 30 S- und 50 S-Untereinheit, Messenger-tRNA, formyl-methionyl-tRNA unter Beteiligung der Initiationsfaktoren IF 1, IF 2, IF 3 und GTP,
2. Elongation - a) Bindung der beladenen tRNA an den Ribosomenkomplex unter Beteiligung der Elongationsfaktoren EF Tu, EF Ts und GTP, b) Knüpfung der Peptidbindung mit Hilfe der Peptidyltransferase, die Bestandteil der 50 S-Untereinheit ist, c) Translokation, ein Vorgang, der die anschließende Bewegung des Ribosomenkomplexes unter Beteiligung des Elongationsfaktors EF G entlang der mRNA einschließt, wobei die Peptidyl-tRNA von der "A site" in die "P site" gelangt, die unbeladene tRNA frei und GTP hydrolysiert wird,
3. Termination - Beendigung der Proteinsynthese unter Beteiligung der Terminationsfaktoren R 1 und R 2 zur Erkennung der Nonsense Codons, der die Auflösung des Ribosomen-, mRNA-, peptidyl-Komplexes folgt.

Testansatz: Jeder 250 μ l Ansatz enthält

100 mM Tris-HCl, pH 7,8,
8 mM Mg(OAc)₂,
50 mM KCl,
6 mM β -Mercaptoaethanol,
250 μ Mol ATP, 7,5 μ Mol GTP,
5 μ Mol AS mit einer spezifischen Radioaktivität von ca. 50 mCi/mMol,
40 μ g Poly U,
10 - 20 A₂₆₀ Ribosomen und ca.
20 μ g S-100 Protein.

Durchführung: Für die zellfreie Protein-Synthese wird eine Präparation ganzer Ribosomen (2.4.) verwendet, die noch zum Teil endogenen Messenger enthält. Alle Enzyme und die für die Protein-Synthese benötigten Faktoren sind nach der Zellfraktionierung im S-100-Überstand vorhanden. Als mRNA wird ein artifizieller Messenger in Form von Polyuridylsäure verwendet, der unter normalen Bedingungen nur für Phenylalanin tRNA codiert. Das entstehende Peptid ist ein Polyphenylalanin, das am Ribosomenkomplex haften bleibt. Die Aktivierung und Veresterung des Phenylalanins mit seiner tRNA ist in den Test mit eingeschlossen. Die benötigte Energie wird von einem ATP-GTP-regenerierenden System zur Verfügung gestellt, das für die Rephosphorylierung des verbrauchten ATPs und GTPs entweder Phosphoenolpyruvat und Phosphoenolpyruvatkinase oder Kreatininphosphat und Kreatininphosphokinase enthält. Die Wahl einer geeigneten Magnesium-Konzentration (s. Teil Ergebnisse) ist unbedingt notwendig.

Die Reaktion wird nach 10 Minuten Präinkubation bei 37°C durch Zugabe von Poly U gestartet. Meßgröße ist die Radioaktivität des gebildeten Poly-¹⁴C-Phenylalanins, sie wird durch äquivalente Entnahmen mit der Filterplättchen-Methode, die für den Akzeptor-Aktivitäts-Test bereits beschrieben wurde, bestimmt. Jedoch wird nach der ersten Wäsche mit kalter 5%iger TCA zur Hydrolyse der mitausge-

fällten aminocyl-tRNAs eine Inkubation der Testprobe für 15 Minuten bei 90°C in 5%iger TCA eingeschoben. Der Gehalt an Polyphenylalanin wird in nMol Phenylalanin pro nMol Ribosomen angegeben. Die Umrechnung von A₂₆₀ Ribosomen auf nMol erfolgt über das Molekulargewicht:

$$\text{MG Ribosomen} = 2,7 \times 10^6.$$

Das Peptidisierungssystem ist bei Campbell und Sargent beschrieben (1967 und 1969).

2.9. Ribosomenbindungstest

Prinzip: Acylierte tRNA wird im Reagenzglas in Gegenwart von Ribosomen, ihrem Anticodon entsprechend, in einem nicht enzymatischen Vorgang an ein geeignetes Triplet oder Polyribonucleotid (Messenger) gebunden (Kaji und Kaji (1964), Spyrides (1964), Arlinghaus et al. (1964) und Nirenberg und Leder (1964)). Meßgröße für die Bindungskapazität des Ribosomen-Triplate-Komplexes ist die radioaktiv markierte Aminosäure an der spezifischen tRNA.

Reaktionsansatz: Jeder 50 µl Ansatz enthält

0,10 M Tris-Acetat, pH 7,2 ,

0,02 M Mg(OAc)₂ ,

0,05 M KCl ,

50 µM Basenrest Poly U oder

13 µg Poly U₂C ,

2 A₂₆₀ gewaschene Ribosomen und verschiedene Mengen von ¹⁴C-markierter phe-tRNA^{Phe}.

(Acylierung siehe unter 2.7.)

Ausführung: Der Ribosomenbindungstest wurde nach der Millipore-Filter-Technik von Nirenberg und Leder (1964) durchgeführt. Dieser Test wird auch von Kaji (1968) beschrieben.

Gestartet wird die Reaktion mit der ¹⁴C-markierten phe-tRNA^{Phe}. Wird Poly-Nucleotid zuletzt zugegeben, ist

die Bindung geringer (Nirenberg und Leder, 1964). Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 24°C im Wasserbad. Nach der Beendigung der Inkubation wurden die Ansätze sofort in ein Eiswasserbad gebracht und mit 3 ml eiskaltem Puffer der Zusammensetzung:

0,1 M Tris-Acetat, pH 7,2,
0,02 M $\text{Mg}(\text{OAc})_2$,
0,05 M KCl

aufgefüllt. Die Ribosomen und der Ribosomenkomplex wurden auf Nitro-Cellulose-Filter abgesaugt und zweimal mit je 3 ml desselben Puffers zur Entfernung der überschüssigen, nicht gebundenen aminoacyl-tRNA gewaschen. Die Radioaktivität der luftgetrockneten Filter wurde im Scintillationszähler gemessen. Es ist wichtig, daß die Ansätze nach der Verdünnung mit dem Puffer sofort abgesaugt werden.

Berechnung der Menge gebundener aminoacyl-tRNA: Acylierte tRNA wird je nach Art der tRNA und dem sie umgebenden Milieu mehr oder weniger schnell desacyliert. Die genaue Kontrolle der noch vorhandenen aminoacyl-tRNA ist vor jedem Ribosomenbindungstest unbedingt erforderlich: 10 μl aminoacyl-tRNA werden auf ein Papierfilter gegeben, wie im Akzeptor-Aktivitäts-Test getrocknet und die Radioaktivität gezählt. Ebenfalls 10 μl werden zur Messung der optischen Dichte verwendet. Aus den cpm und der optischen Dichte dieser 10 μl kann die spezifische Aktivität der aminoacyl-tRNA - ausgedrückt in pMol acylierte Aminosäure pro 1 $A_{260\text{nm}}$ - errechnet werden. Aus der eingesetzten Menge ^{14}C -phe-tRNA^{Phe} und der Ribosomenmenge wird die gebundene tRNA pro Reaktionsansatz berechnet. Die Umrechnung auf pMol gebundene ^{14}C -phe-tRNA^{Phe} pro 1 nMol Ribosomen erfolgt über die Angabe von Nirenberg und Matthaei (1961):

1 nMol Ribosomen = $45,7 A_{260\text{nm}}$.

2.10. Jod-Oxidation

Die Oxidation der tRNAs wurde nach der Methode von Fittler und Hall (1966) durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 0,01 M Tris-HCl, pH 7,0, 6 g Kaliumjodid pro Liter und 0,75 g elementares Jod pro Liter. Die Oxidation wurde für 10 Minuten, vier Stunden oder acht Stunden bei 25°C im Wasserbad durchgeführt und wurde beendet, indem die Ansätze sofort gegen kaltes Wasser, das 10^{-2} M Magnesium-Ionen enthielt, in der Kälte dialysiert wurden. Die Dialyse fand für zweimal zwei Stunden oder über Nacht statt. Nach der Oxidation wurde die optische Dichte der Ansätze kontrolliert, dann erfolgte die Acylierung der tRNAs in beschriebener Weise.

3. Ergebnisse

3.1. Eigenheiten der verwendeten Bakterienstämme

3.1.1. Argininauxotrophie

Bakterien benötigen zum Wachstum außer einer Energiequelle, die in Form von Glukose angeboten wird, keine organischen Substanzen im Medium. Sie sind befähigt, alle Aminosäuren aus einer anorganischen Stickstoffquelle selbst zu synthetisieren. Solche Synthesen sind an genetische Kontrollen gebunden. Die Schädigung eines für die Aminosäurensynthese verantwortlichen Gens kann zu einer Mutante führen, die gegenüber dem Wildtyp für eine Aminosäure, bzw., wenn mehrere Gene geschädigt sind, für mehrere Aminosäuren auxotroph wird. Das bedeutet, daß das mutierte Bakterium nicht mehr teilungsfähig ist, es sei denn, die essentielle(n) Aminosäure(n) wird (werden) dem Nährmedium zugesetzt. Die ersten Aminosäure-Mangelmutanten wurden von J.E. Lederberg (1952) erzeugt.

Für die Untersuchungen wurden zwei isogenetische Stämme RC^{str} und RC^{rel} der Mangelmutante des Wildstammes E. coli K12 verwendet, die für Arginin und zusätzlich für Thiamin auxotroph sind. Bei einer Konzentration von 100 ng Thiamin pro ml Medium ist das Wachstum nur noch abhängig vom Argininangebot.

Tab. 1: Abhängigkeit der Bakterienausbeute von der Argininkonzentration bei E.coli K 12

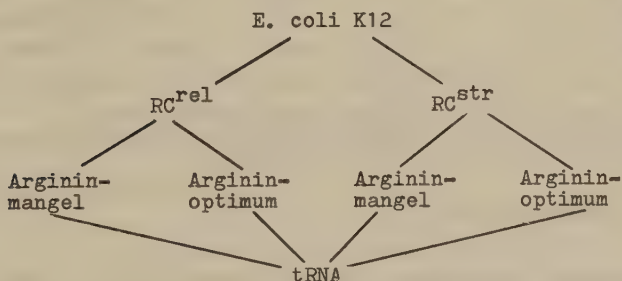
Bakterien	Arginin $\mu\text{g/ml}$	A_{260}	g/l^*
RC^{str}	10	0,4	0,55
	20	0,8	0,83
	60	1,7	2,50
	100	1,9	2,83
RC^{rel}	10	0,4	0,55
	60	1,7	2,50

* Diese Angabe bezieht sich auf das Feuchtgewicht

Die Aufhebung der strengen Kontrolle zwischen Protein- und RNA-Synthese durch die Mutation des rel-Gens hat keinen Einfluß auf die Auxotrophie für Arginin.

3.1.2. Bakterienzüchtungen zur Isolierung von tRNAs

Das folgende Schema gibt einen zusammenfassenden Überblick, aus welchen Bakterienkulturen, unter welchen Wachstumsbedingungen Transfer-Ribonucleinsäuren isoliert wurden.



Für die tRNA-Präparation wurden die Bakterien vier Stunden in der stationären Phase gehalten. Der Arginin-Mangelzustand wurde mit 10 µg Arginin pro ml Medium erreicht. Als optimale Arginin-Konzentration wurden 60 µg pro ml gewählt.

Die anderen Bakterienkulturen, die verwendet wurden, sind mit Angabe ihrer Erträge, ihrer Wachstumsbedingungen und ihrer Verwendungszwecke in Tabelle 2 zu ersehen.

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Bakterienkulturen

E. coli-Stamm	Arginin µg/ml	A ₂₆₀	g/l [*]	Verwendung
RC ^{rel} Arg ⁻	10	0,4	0,55	tRNA
RC ^{rel} Arg ⁻	60	1,7	2,50	tRNA
RC ^{str} Arg ⁻	10	0,4	0,55	tRNA
RC ^{str} Arg ⁻	60	1,7	2,50	tRNA
MRE 600	0	1,0	1,40	Ribosomen
MRE 600	60	1,9	2,70	tRNA
MRE 600	0 †	2,2	6,80	tRNA

*Diese Angabe bezieht sich auf das Feuchtgewicht.

† Das Nährmedium enthielt alle Aminosäuren in einer Konzentration von je 350 µM, aber kein Arginin.

3.1.3. tRNA-Ausbeuten

Die für Arginin auxotrophen Bakterien enthielten viel Protein in den Zellen, die mit dem höchsten Arginin-Angebot gewachsen waren. Dagegen war die Menge der isolierten tRNAs der Arginin-Konzentration des Mediums umgekehrt proportional. Die tRNA-Ausbeuten verschiedener Bakterienzüchtungen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die untersuchten Bakterienkulturen verhielten sich bei der tRNA-Präparation sehr unterschiedlich. Bemerkenswert ist die gute Isolierbarkeit der tRNAs aus E. coli MRE 600, für die das Aminosäuregemisch unter Auslassung des Arginins die Bedingungen des Maximalmediums erfüllte. Wachsen die gleichen Bakterien in einem gebräuchlichen Maximalmedium (Pepton-Agar-Gemisch), lassen sich die Transfer-Ribonucleinsäuren sehr viel schlechter extrahieren. Die unterschiedliche Extrahierbarkeit der tRNAs wird auf Veränderungen in der Membranstruktur zurückgeführt, wenn die Keime in einem kompletten Medium wuchsen.

Der hohe tRNA-Gehalt der rel⁻-Mutante, die unter Arginin-Mangelbedingungen gezüchtet wurde, läßt sich damit erklären, daß unter diesen Bedingungen in der Zelle auch dann noch

RNA gebildet wird, wenn die Protein-Synthese nach Verbrauch der essentiellen Aminosäure aufhört: Der Quotient RNA/Protein, bzw. RNA/Trocken- oder Feuchtgewicht steigt an.

Tab. 3: tRNA-Ausbeuten aus verschiedenen E. coli-Stämmen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Mediums

E. coli-Stamm	Arginin μg/ml	A ₂₆₀ /g
RC ^{str}	10	26
	20	15
	60	9
	100	9
RC ^{rel}	10	100
	60	10
MRE 600	60	27
	AS, -Arg [*]	27

Die Werte für A₂₆₀/g sind mit einer Ausnahme (RC^{rel} 10 μg) Mittelwerte aus fünf verschiedenen Präparationen und beziehen sich auf Gramm Feuchtgewicht. Erklärung für * s. Tab. 2

3.2. Chromatographisches Verhalten von phe-tRNA^{Phe}

3.2.1. Wahl der Methode zur Trennung verschiedener tRNA-Species

Es werden heute sehr viele Techniken mit mehr oder weniger gutem Erfolg angewandt, um ein Gesamtgemisch von tRNAs in einzelne tRNA-Species zu trennen. Die erfolgreichste präparative Trennung, die die reinsten tRNAs liefert, beruht auf dem Prinzip der Gegenstromverteilung. Dieses Verfahren ist nicht nur sehr kostspielig und aufwendig, es setzt auch eine genügend große Menge Ausgangsmaterial voraus. Viele spezifische tRNAs lassen sich mit diesem Verfahren so rein isolieren, daß sie für Sequenzanalysen verwendet werden

können (Apgar et al., 1962; Doctor et al., 1961; Goldstein et al., 1964; Thiebe und Zachau, 1965).

Eine Alternative zum Gegenstromverfahren bieten die Methoden der Säulenchromatographie zur Trennung von tRNAs. Die erste Technik war die Chromatographie an methyliertem Serumalbumin-Kieselguhr (MAK).

Als Anionen-Austauscher werden außerdem DEAE-Cellulose (Cheayil und Bock, 1965) und DEAE-Sephadex benutzt. Sie zeichnen sich durch eine hohe Kapazität für Nucleinsäuren aus. Die Trennfähigkeit beruht nicht allein auf den Ionen-Austauscheigenschaften der Säule. Alle tRNAs sind in Größe und Ladung sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich in der Basensequenz und damit im Gehalt an Purin- und Pyrimidin-Basen: Purin-Basen binden fester an die Austauscher als Pyrimidin-Basen. Daher trennen sich die tRNAs unterschiedlichen Purin- und Pyrimidin-Gehaltes. Durch Variation von Säulenlänge, Wasserstoff-Ionenkonzentration, Temperatur und Ionenstärke lassen sich viele tRNA-Species voneinander trennen. DEAE-Sephadex enthält eine Dextranmatrix. Kawada et al. (1963) führte ausgedehnte Vergleichsstudien über die Trennungseigenschaften von DEAE-Sephadex und DEAE-Cellulose am Beispiel von Transfer-Ribonucleinsäuren durch. Das Sephadex erwies sich als wesentlich geeigneter. Nishimura et al. konnte an DEAE-Sephadex Methionin-, Valin-, Phenylalanin- und Tyrosin-spezifische tRNAs trennen und reinigen. Jedoch sollen sich untermethylierte tRNAs während der Trennung an DEAE-Sephadex sehr instabil verhalten; dieses Phänomen wird nicht beobachtet, wenn gleiche tRNAs an DEAE-Cellulose getrennt werden (Aschoff, persönliche Mitteilung).

Gillam et al. (1967) nutzte die besondere Wechselwirkung zwischen aromatischen Gruppen der benzoilylierten Cellulose (BD-Cellulose) mit den aromatischen oder hydrophoben Gruppen der tRNA zur Trennung aus. Auf Grund dieser Besonderheit können tRNA-Moleküle, die aromatische Aminosäuren wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan akzeptieren oder solche, die eine Base mit lipophilen Eigenschaften besitzen, bevorzugt getrennt werden. Dieses Verfahren ermöglicht in Kombi-

nation mit anderen chromatographischen Methoden die Isolierung reiner tRNA-Species, die für die Sequenzanalyse oder für die in vitro Protein-Synthese verwendet werden.

Die Verteilungschromatographie vereinigt in sich das hohe Auflösungsvermögen des Gegenstromverfahrens mit der Einfachheit der Säulentrennung. Es kann zusätzlich mit einem Ionenaustausch kombiniert werden. Bei der Verteilungschromatographie wird eine stationäre organische Phase an das Säulenmaterial adsorbiert. Kelmers et al. entwickelte nach diesem Prinzip 1965 die Reversed-Phase-Chromatography. Khym (1966) verteilte die tRNA zwischen einer wäßrigen Salzlösung und einer Trichlorfluoraethanphase an einem inerten Träger. Eine Gradienten-Verteilungschromatographie an Sephadex wurde von Münch und Berg durchgeführt. Pearson und Kelmers (1966) benutzten Hydroxyapatit als Matrix für die stationäre Phase.

Am intensivsten wurde in den letzten Jahren die Reversed-Phase-Chromatography weiterentwickelt. Sechs verschiedene Systeme sind inzwischen bekannt. Wurde bei den ersten Verfahren der Austauscher noch in organischen Lösungsmitteln gelöst, so wird der Träger heute direkt beschichtet. Pearson et al. (1971) benutzte als Trägermaterial Teflonharze.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Charakterisierung spezifischer tRNAs zunächst die Chromatographie an benzoylierter Cellulose und dann die Reversed-Phase-Chromatography nach Kelmers (RPC-5) als analytisches Verfahren benutzt.

3.2.2. Trennung von phe-tRNA^{Phe} aus E. coli an BD-Cellulose

Abbildung 1 zeigt das typische Elutionsprofil eines tRNA-Gesamtgemisches aus E. coli MRE 600. Vor der Chromatographie wurde das Gesamtgemisch der tRNAs mit Arginin und Phenylalanin beladen (siehe Material und Methoden sowie Legende von Abb. 1). Als Beispiel für eine tRNA, die sich im Hauptgipfel der optischen Dichte findet, wurde tRNA^{Arg}, als Beispiel für eine tRNA, die eine festere Bindungsfähigkeit zur BD-Cellulose hat und erst am Ende eines kleineren Gipfels optischer Dichte erscheint, wurde tRNA^{Phe} gewählt.

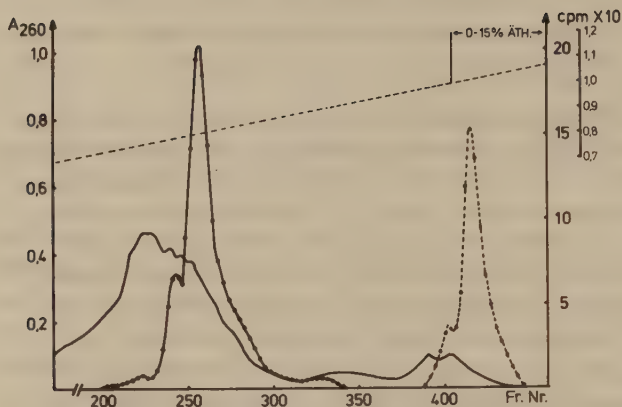


Abb. 1: Typisches Elutionsprofil einer Gesamt-tRNA
Präparation an BD-Cellulose

100 A₂₆₀ Einheiten tRNA aus E.coli MRE 600 wurden mit ¹⁴C-Phenylalanin, spez. Akt. 98 mCi/mMol und ³H-Arginin, spez. Akt. 580 mCi/mMol beladen. Die Konzentration des Phenylalanins betrug 2,5 nMol/A₂₆₀, des Arginins 2,15 nMol/A₂₆₀. Nach der Acylierung wurde die tRNA phenolisiert und die wäßrige Phase nach restlicher Entfernung des Phenols mit Äther auf die Säule gegeben. (Weitere Angaben siehe Material und Methoden)

—•—•—•— ³H-Arginin -•-•-•-•- ¹⁴C-Phenylalanin
————— A₂₆₀ - - - - - Molarität von NaCl

Gibt man ein Gesamtgemisch von tRNAs aus *E. coli* MRE 600 auf eine BD-Cellulose-Säule, so lassen sich fast alle tRNAs mit einem NaCl-Gradienten zwischen 0,4 M und 1,0 M eluieren. Die Phenylalanin-spezifische tRNA wird erst mit einem Aethanol-Gradienten von 0 - 15% vom Säulenmaterial abgelöst. Ein ganz geringer Teil von phe-tRNA^{Phe} wird schon mit dem reinen NaCl-Puffer eluiert.

Abbildung 2 zeigt das typische Elutionsprofil von tRNA^{Phe}. Das Verhalten von phe-tRNA^{Phe} an BD-Cellulose ist nicht nur auf den aromatischen Teil der Aminosäure zurückzuführen, sondern hängt auch von der Basenzusammensetzung des tRNA-Moleküls ab. Phenylalanin-spezifische tRNAs verschiedener Mikroorganismen zeigen Differenzen in ihren chromatographischen Elutionsprofilen. Wird die Konzentration des Salzgradienten auf 1,2 M NaCl erhöht, ist kein Aethanolzusatz mehr notwendig, um die phe-tRNA^{Phe} von *E. coli* MRE 600 abzulösen. Ein NaCl-Gehalt von 1,6 M reicht für eine tRNA-Präparation aus *B. subtilis* noch nicht aus, um phe-tRNA^{Phe} zu eluieren (Arnold, 1973). Gillam et al. (1967) chromatographierte ein tRNA-Gemisch aus Hefe an BD-Cellulose. Die Endkonzentration seines Salzgradienten betrug 1,2 M. Die phe-tRNA^{Phe} blieb am Säulenmaterial haften und konnte erst mit einem Aethanolzusatz eluiert werden.

3.2.3. Trennung von phe-tRNA^{Phe} aus *E. coli* RC^{rel} arg⁻ thi⁻ - gezüchtet unter Arginin-Mangelbedingungen - (BD-Cellulose)

Die im Abschnitt 3.2.2. beschriebenen Versuche haben ergeben, daß - in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur - in *E. coli* hauptsächlich eine spezifische tRNA für Phenylalanin vorkommt. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob ein Aminosäure-Mangel in *E. coli*-Mutanten, bei denen die strenge Kontrolle zwischen RNA- und Proteinsynthese aufgehoben ist, zur Bildung von isoakzeptierenden tRNAs für Phenylalanin führt. Solche isoakzeptierenden tRNAs für Phenylalanin sind in *E. coli* Wildtypen nach Behandlung mit Chloramphenicol (Waters, 1973 und Mann und Huang, 1973) und in

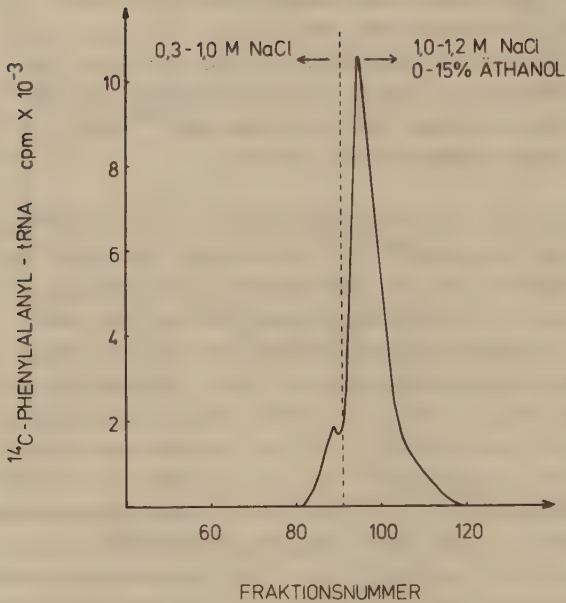


Abb. 2: Chromatographie von phe-tRNA^{Phe} aus E.coli MRE 600 an BD-Cellulose

20 A_{260} Einheiten Gesamt-tRNA wurden mit ^{14}C -Phenylalanin - spez. Akt. 49,2 mCi/mMol - beladen. Die Konzentration des Phenylalanins betrug 2,5 nMol/ A_{260} . Nach der Acylierung wurde die tRNA phenolisiert und die wäßrige Phase nach restlicher Entfernung des Phenols mit Äther auf die Säule gegeben. (Weitere Angaben siehe 2.6.1.)

B. subtilis nach Behandlung mit Pactamycin (H. Kersten, 1968) beobachtet worden. Chloramphenicol und Pactamycin heben die strenge Kontrolle zwischen RNA- und Proteinsynthese auf, so daß es zur Akkumulation von RNA in der Zelle kommt.

Es wurden tRNA-Gemische aus der *E. coli*-Mutante $\text{arg}^- \text{thi}^-$ - gezüchtet unter Arginin-Mangel - isoliert und auf eine BD-Cellulose-Säule gegeben. Ließ man die Bakterien in einem synthetischen Minimalmedium wachsen, dem sehr wenig Arginin zugesetzt wurde (10 µg/ml Medium), so zeigte das Elutionsprofil der isolierten tRNA zwei große Gipfel für $\text{phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ (siehe Abb. 3). Einer dieser beiden Gipfel wurde schon mit dem reinen Salzgradienten, der zweite erst mit dem Aethanolgradienten abgelöst.

Dieses Ergebnis entsprach zunächst der Erwartung, daß das Auftreten isoakzeptierender tRNA-Species für Phenylalanin mit der Aufhebung der strengen Kontrolle in Bakterien korreliert sein könnte. Alle weiteren Versuche, dieses Phänomen näher zu erklären, wurden im folgenden mit der Reversed-Phase-Chromatography (RPC-5) durchgeführt. Das RPC-5-Verfahren und das dazu notwendige Material wurden erst nach Beginn dieser Arbeit zugänglich.

3.2.4. Trennung von $\text{phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ aus *E. coli* RC^{str} und RC^{rel} $\text{arg}^- \text{thi}^-$ - gezüchtet unter Arginin-Mangelbedingungen (RPC-5)

Prinzipiell ergibt das RPC-5-Verfahren ein ähnliches Elutionsprofil für tRNAs wie ihre Chromatographie mit BD-Cellulose. Ein Gesamtgemisch von tRNAs wird in drei Hauptfraktionen getrennt. Der erste Bereich der optischen Dichte enthält hauptsächlich die für Methionin spezifischen tRNAs. Im zweiten Bereich werden eine große Anzahl aminoacyl-tRNAs isoliert. Bei höheren Salzkonzentrationen werden phenylalanyl-, leucyl-, seryl-, thyrosyl-, cysteinyl und tryptophanyl-tRNAs eluiert (Kelmers et al., 1965). Das Auflösungsvermögen der RPC-5-Säule ist um ein Vielfaches größer und die Handhabung des Materials einfacher als das Arbeiten mit der BD-Cellulose.

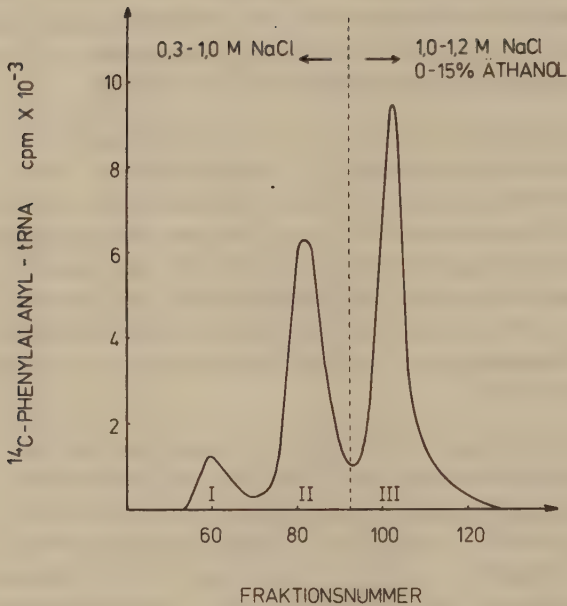


Abb. 3: Chromatographie von phe-tRNA^{Phe} aus E.coli RC^{rel}_{arg⁻thi⁻} - gezüchtet im Argininmangel - an BD-Cellulose

20 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA wurden mit ^{14}C -Phenylalanin - spez. Akt. 49,2 mCi/mMol - beladen. Die Konzentration des Phenylalanins betrug 2,5 nMol/A₂₆₀. Nach der Acylierung wurde die tRNA phenolisiert und die wäßrige Phase nach restlicher Entfernung des Phenols mit Äther auf die Säule gegeben. (Weitere Angaben siehe 2.6.1.)

Die tRNA-Moleküle, die sich nur in der Modifizierung einer Base unterscheiden, können auf der RPC-Säule noch gut getrennt werden.

Gesamt-tRNAs wurden aus *E. coli* RC^{str} und *E. coli*^{rel}, die unter Arginin-Mangelbedingungen gezüchtet und zu Beginn der stationären Phase geerntet wurden, isoliert, mit Phenylalanin beladen und mit dem RPC-5-Verfahren analysiert. Abbildung 4 zeigt die Elutionsprofile. Während in tRNAs aus Keimen mit der strengen Kontrolle nur ein Hauptgipfel mit Phenylalanin-Akzeptor-Aktivität gefunden wird wie im Wildtyp, zeigt das Elutionsprofil der tRNAs aus Keimen mit entkoppelter Kontrolle zwei Hauptgipfel mit Akzeptor-Aktivitäten für Phenylalanin, die in der Reihenfolge ihrer Elution im weiteren mit Typ I und Typ II bezeichnet werden sollen. Die Maxima der für die beiden Typen charakteristischen Gipfel liegen 70 Fraktionen auseinander. Der erste Hauptgipfel wird bei einer Salzkonzentration des Gradienten von 0,57 M NaCl, der zweite bei 0,68 M eluiert. Wird die gesamte eluierte Radioaktivität gleich 100% gesetzt, läßt sich berechnen, daß Typ I in der rel⁻-Mutante etwa 50% der Gesamt-Aktivität ausmacht, während er in der rel⁺-Mutante kaum nachzuweisen ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Etwa 25% der gesamten Aktivität entfallen auf zwei bis drei kleinere Gipfel, die immer wieder gefunden wurden und auch von anderen Autoren beschrieben sind. Hierbei kann es sich um Aggregate oder um unreife Vorstufen von tRNA^{Phe} handeln.

Tab. 4: Relative Verteilung von tRNA^{Phe} Isoakzeptoren (Typ I und Typ II) unter Arginin-Mangelbedingungen

tRNA-Quelle	% der gesamteluierten Radioaktivität		
	Typ I	Typ II	Rest
<i>E. coli</i> Arg ⁻ RC ^{str}	2	66	32
<i>E. coli</i> Arg ⁻ RC ^{rel}	46	30	24

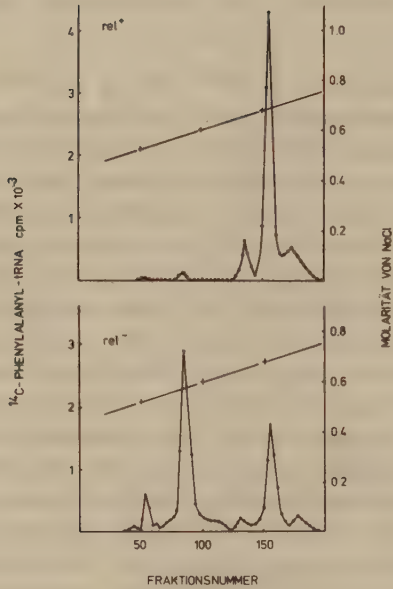


Abb. 4: Chromatographie von phe-tRNA^{Phe} aus E.coli RC^{str} arg⁻thi⁻ (obere Abb.) und E.coli RC^{rel} arg⁻thi⁻ (untere Abb.) - beide im Argininmangel gezüchtet - im RPC-5-System

Jeweils 20 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA wurden mit ¹⁴C-Phenylalanin - spez. Akt. 98,4 mCi/mMol - beladen. Die Phenylalanin-Konzentration betrug 2,78 nMol/A₂₆₀. Zur Rückgewinnung der tRNA wurde der Acylierungsansatz über eine kleine DEAE-Cellulose-Säule gegeben. Während der RP-Chromatographie wurde die Säule konstant auf 25°C gehalten. (Weitere Angaben siehe 2.6.2. und 2.6.4.)

Nur unter Bedingungen der entkoppelten RNA- und Proteinsynthese (rel^- -Mutation) führt ein Aminosäure-Mangel zur Anhäufung einer isoakzeptierenden Species für $tRNA^{Phe}$. So wie bei diesen Untersuchungen das Phänomen mit Arginin-Mangel erreicht wurde, konnten es Wettstein und Stent (1968) an einer Leucin-auxotrophen Mutante von *E. coli* nach Leucin-Mangel und Raettig (persönliche Mitteilung) mit Methionin in *E. coli met^-* nach Methionin-Mangel beobachten. Waters et al. (1973) fanden in entsprechenden für Phenylalanin auxotrophen rel^- -Mutanten von *E. coli* einen zusätzlichen isoakzeptierenden tRNA-Typ für Phenylalanin. Die arginyl- und lysyl-tRNA-Profile zeigten die gleichen Veränderungen wie jene der entsprechenden CAP-behandelten tRNAs.

Bei allen Untersuchungen wurde ein tRNA-Gemisch von *E. coli* MRE 600 mitgeprüft. Das Elutionsprofil für $phe-tRNA^{Phe}$ entspricht in allen Eigenschaften dem der Mutante RC^{str} unter Aminosäure-Mangelbedingungen. Die für Phenylalanin gefundene tRNA-Form, die dem Typ II entspricht, wird in allen *E. coli*-Species gefunden. Die Sequenzanalyse dieser tRNA wurde von Barrell und Sanger (1969) durchgeführt (siehe Anhang 1).

Der kleine Gipfel, der der $tRNA^{Phe}$ Typ II vorausläuft, wird von Staehelin (persönliche Mitteilung) als weiterer Typ von tRNA beschrieben. Von anderen Autoren wird dieser Typ meist nicht genannt. Wahrscheinlich ist das Auftreten des kleinen Gipfels von der Wahl der Bedingungen abhängig.

3.2.5. Chromatographisches Verhalten von $phe-tRNA^{Phe}$ aus *E. coli* RC^{str} und RC^{rel} - gezüchtet bei optimaler Arginin-Konzentration (RPC-5)

Aus den vorliegenden Befunden ergaben sich folgende Fragen:

1. Welche $phe-tRNA$ -Typen kommen in *E. coli* RC^{rel} vor, wenn die Keime bei ausreichendem Angebot von Arginin gezüchtet werden?
2. Könnte es sich bei der isoakzeptierenden tRNA-Species vom Typ I um eine Fehlbeladung oder um eine untermodifizierte oder unreife Form von $tRNA^{Phe}$ handeln?

Entgegen den Erwartungen zeigte das Experiment, daß in beiden Mutanten bei einem ausreichenden oder überschüssigen Angebot von Arginin Typ I der tRNA^{Phe} entsteht. Abbildung 5 zeigt zwei sehr ähnliche Elutionsprofile beider Mutanten. Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, enthalten beide tRNA-Populationen ca. 70% der gesamteluierten Radioaktivität als Typ I und nur 10 - 20% des normalen Typs II. Da die unter Arginin-Überschuß gefundene neue Form mit der gleichen Salzkonzentration des Gradienten von der Säule abzulösen ist wie die neue Form der RC^{rel}-Bakterien, die im Arginin-Mangelmedium wuchsen, wurde die gleiche Typenbezeichnung I und II beibehalten.

Tab. 5: Relative Verteilung von tRNA^{Phe} Typ I und Typ II aus den Mutanten - gezüchtet mit Arginin im Überschuß

tRNA-Quelle	% der gesamteluierten Radioaktivität		
	Typ I	Typ II	Rest
E. coli Arg ⁻ RC ^{str}	72	20	8
E. coli Arg ⁻ RC ^{rel}	64	12	24

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Arginin die relative Verteilung von spezifischer tRNA^{Phe} Typ I und Typ II in den E. coli-Mutanten zugunsten von Typ I verschiebt. Dieser Effekt ist unabhängig vom rel-Gen und spezifisch für Arginin.

3.2.6. Bezeichnung verschiedener Typen von tRNA^{Phe} auf Grund des Elutionsverhaltens an RPC-5-Säulen

In den Elutionsprofilen wurden neben den Hauptgipfeln von tRNA^{Phe} immer wieder kleinere radioaktive Gipfel gefunden. Wie zahlreiche Co-Chromatographien zeigten, sind auch diese von tRNA-Präparation zu tRNA-Präparation und von Chromatographie zu Chromatographie identisch.

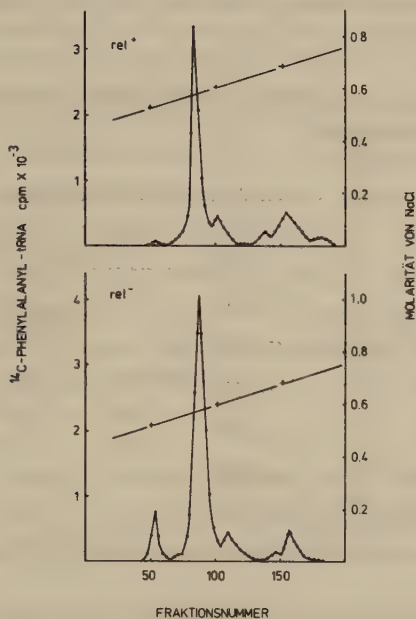


Abb. 5: Chromatographie von phe-tRNA^{Phe} aus E.coli RC^{str} arg⁻thi⁻ (obere Abb.) und E.coli RC^{rel} arg⁻thi⁻ (untere Abb.) - beide gezüchtet mit 60 µg Arginin/ml Medium - im RPC-5-System

Jeweils 20 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA wurden acyliert und chromatographiert. Bedingungen siehe Legende von Abb.4

Zur besseren Orientierung sollen die einzelnen Gipfel im weiteren eine Typenbezeichnung erhalten, die der folgenden Tabelle zu entnehmen ist.

Tab. 6: Bezeichnung der einzelnen mit Phenylalanin markierten Fraktionen

Fraktionen	Ablösekonzentration	tRNA-Typ
45 - 65	0,520	I ₀
75 - 100	0,570	I
100 - 120	0,615	I _a
125 - 140	0,645	II ₀
140 - 170	0,680	II
170 - 190	0,720	II _a

Die in den bisherigen Tabellen angegebenen Restaktivitäten ergeben sich aus der Summe der Einzelaktivitäten der Typen I₀, I_a, II₀, II_a und sind im einzelnen in der zusammenfassenden Tabelle im Anhang dieser Arbeit zu finden. Die Typen I_a und II_a sind vermutlich Aggregate der Typen I und II. Die relativen Mengen dieser Typen schwanken beträchtlich von Präparation zu Präparation und können bis zu 30% der insgesamt eluierten Radioaktivität betragen. Der Typ I₀ ist möglicherweise eine weitere phenylisoakzeptierende tRNA. Inwieweit gleiches für Typ II₀ zutrifft, muß noch geklärt werden.

3.3. Arginin-bedingte Akkumulation von tRNA^{Phe} Typ I

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wurde vermutet, daß die Anhäufung von Typ I der tRNA^{Phe}, zu der es bei hohem Arginin-Angebot in rel⁺- und rel⁻-Keimen kommt, ein für

Arginin spezifisches Phänomen und möglicherweise die Folge der Veränderungen im Arginin-Stoffwechsel der Zellen ist. Es wurde daher versucht, zu klären, ob zwischen der Akkumulation des Typs I der $tRNA^{Phe}$ und dem Arginin-Gehalt im Nährmedium eine Korrelation besteht. Bei einem spezifischen Arginin-Effekt sollte sich das relative Verhältnis von Typ I zu Typ II in Abhängigkeit von der Arginin-Konzentration während der Züchtung ändern.

3.3.1. E. coli RC^{str}

Der E. coli-Stamm RC^{str} arg⁻ thi⁻ wurde mit 10, 20, 60 und 100 µg Arginin pro ml Nährmedium gezüchtet und die relative Verteilung der Isoakzeptoren Typ I und Typ II in den isolierten tRNAs bestimmt.

Tab. 7: Relative Verteilung der $tRNA^{Phe}$ -Isoakzeptoren Typ I und Typ II in Abhängigkeit von der Arginin-Konzentration in E. coli RC^{str}

Arginin µg/ml	% der gesamteluierten Radioaktivität		
	Typ I	Typ II	Rest
10	2	66	32
20	25	53	22
60	72	20	8
100	69	21	10

Der Zusammenhang, der zwischen der Arginin-Konzentration und der Akkumulation von Typ I im Verhältnis zu Typ II von $tRNA^{Phe}$ besteht, ist in Abbildung 6 und Tabelle 7 dargestellt. Werden die Bakterienkulturen mit einer Arginin-Konzentration von 10 µg/ml (Mangel) gezüchtet, betragen die Bakterienausbeuten nur 10% der Ausbeuten, die von Keimen erreicht werden, denen ein optimales Arginin-Angebot zur Verfügung steht. $tRNA^{Phe}$

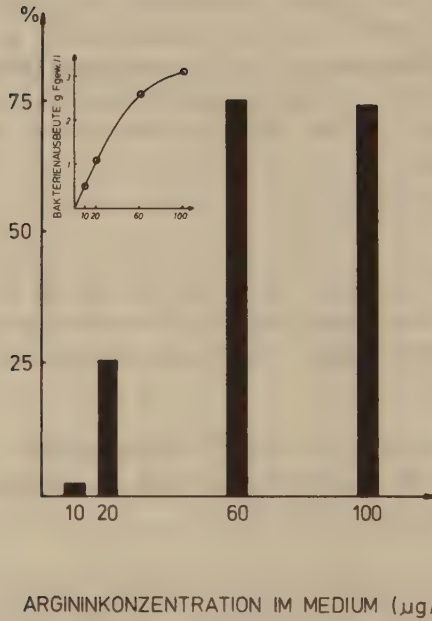


Abb. 6: Relatives Vorkommen von tRNA^{Phe} Typ I in Abhängigkeit von der Argininkonzentration des Mediums (große Darstellung) verglichen mit der Bakterienausbeute in Abhängigkeit von der Argininkonzentration des Mediums (kleine Darstellung)

vom Typ I entsteht kaum unter Arginin-Mangelbedingungen. Ein Arginin-Gehalt von 60 µg/ml führt zur maximal erreichbaren Akkumulation des Typs I der tRNA^{Phe}. Wird der Arginin-Gehalt darüberhinaus erhöht, nimmt zwar die Bakterienbeute noch zu, das Verhältnis von Typ I zu Typ II der tRNA^{aus} bleibt aber unverändert.

3.3.2. E. coli MRE 600

Zur Klärung der Frage, ob der Arginin-Effekt im Zusammenhang mit der Arginin-Auxotrophie der Mutante von E. coli steht, wurden die Kontroll-Keime - E. coli MRE 600 - in einem Minimalmedium gezüchtet, dem 60 µg Arginin pro ml zugesetzt wurden. Diese Bakterien sind zur eigenen Arginin-Synthese befähigt, stellen diese aber bei Zusatz von Arginin zum Medium ein. Die Konzentration an freiem Arginin in der Zelle könnte durch exogene Zufuhr dieser Aminosäure jedoch höhere Werte erreichen als bei endogener Synthese.

Abbildung 7 zeigt die Veränderung, die das Arginin gegenüber einem normalen Minimal-Salzmedium auf die tRNA^{Phe} bewirkt. Über 40% dieser tRNA^{Phe} liegen nach Arginin-Behandlung von E. coli MRE 600 als Typ I vor. (Tabelle 8).

Es wurde untersucht, ob es sich bei dem beobachteten Phänomen um eine für Arginin spezifische Wirkung handelt:

Dem Nährmedium von E. coli MRE 600 wurden alle anderen Aminosäuren mit Ausnahme von Arginin zugesetzt. Wie die gestrichelte Kurve der Abbildung zeigt, werden unter diesen Bedingungen nur geringe Mengen von tRNA^{Phe} Typ I gebildet. Die Tabelle 8 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Wirkung des Arginins im Vergleich zu den anderen Aminosäuren auf das Vorkommen von Typ I tRNA^{Phe} in E. coli MRE 600.

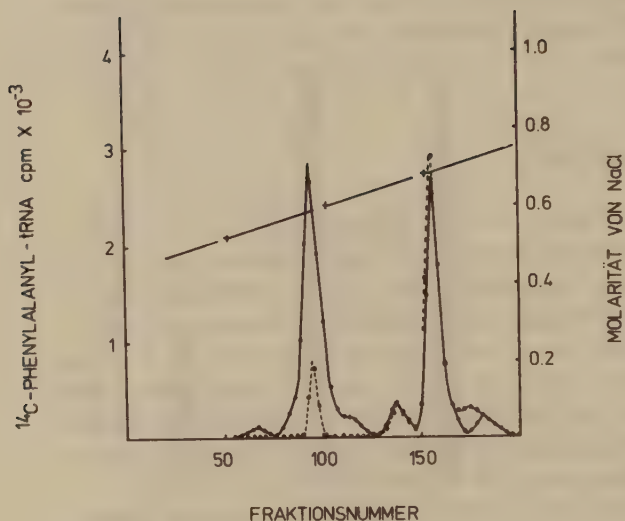


Abb. 7: Ein Vergleich von tRNA^{Phe} Isoakzeptoren aus einer Gesamt-tRNA-Präparation von E.coli MRE 600 - gezüchtet mit 60 µg Arg/ml Medium - —●—●—●—●— mit den tRNA^{Phe} Isoakzeptoren aus einer Gesamt-tRNA-Präparation von E.coli MRE 600 - gezüchtet mit allen Aminosäuren, ausgenommen Arginin, in einer Konzentration von 340 µM - -○-○-○-○-○-

Tab. 8: Relative Verteilung der tRNA^{Phe}-Isoakzeptoren
Typ I und Typ II nach Arginin- oder Aminosäuren-
Behandlung in E. coli MRE 600

Medium-Zusatz	% der gesamteluierten Radioaktivität		
	Typ I	Typ II	Rest
-	0	60	40
Arg	43	34	23
+ AS, - Arg	8	67	35

3.4. Stoffwechselweg des Arginins in E. coli

Exogen zugeführtes Arginin reprimiert wie auch andere dem Medium zugesetzte Aminosäuren in Mikroorganismen die Synthese der Enzyme, die an ihrer Biosynthese beteiligt sind, vorausgesetzt, die Mikroorganismen besitzen keine Auxotrophie für diese Aminosäuren. Da sowohl in den Arginin-auxotrophen Mutanten als auch in der Kontrolle bei Arginin-Zufuhr zum Nährmedium Typ I der tRNA^{Phe} gebildet wird, ist nicht anzunehmen, daß die Bildung indirekt Folge der Repression durch Arginin ist.

Arginin wird nicht allein für die Synthese der Proteine benötigt, es gehört einem verzweigten Stoffwechselweg an dessen Verzweigungspunkt beim Ornithin liegt. Die Ornithin-Synthese beginnt mit der Acetylierung von Glutaminsäure mittels einer spezifischen Acetylase, die durch Arginin über Rückkoppelung (feed-back) gehemmt werden kann. Die gebildete N-Acetylglutaminsäure wird zum Semialdehyd reduziert und anschließend zu N-Acetylornithin transamiliert. Die N-Acetyl-Gruppe wird durch eine spezifische S-Acylase eliminiert. Das so entstandene Ornithin kann zum Putrescin, einem Diamin, das wiederum die Vorstufe anderer Polyamine ist, decarboxyliert werden. Der Weg zum Arginin führt über das Citrullin,

das durch Umsetzung des Ornithins mit dem Carbamylphosphat in einer durch Transcarbamylase katalysierten Reaktion entsteht, welches wiederum unter Mitwirkung von ATP unter Wasserabspaltung mit Aspartat zum Argininsuccinat umgeformt wird. Die Argininsuccinase spaltet das Succinylarginin schließlich zum Arginin und der Fumarsäure.

Da das Arginin schon den ersten Schritt dieses Syntheseweges allosterisch inhibiert, kann der Gehalt an Polyaminen in *E. coli*-Zellen durch Arginin-Zufuhr über diesen Stoffwechselweg nicht ansteigen. Es gibt aber einen anderen Weg zu den Polyaminen aus Arginin. Arginin wird zu Agmatin decarboxyliert, das durch die Agmatin-Harnstoffhydrolase zu Putrescin und Harnstoff hydrolysiert wird (siehe Schema im Anhang 4).

Bei einem Überangebot von Arginin in der Zelle könnte der Polyamin-Gehalt in *E. coli* steigen.

Ganz allgemein könnten für Veränderungen im chromatographischen Verhalten von tRNAs Veränderungen im Polyamin-Gehalt der Zelle verantwortlich sein. Polyamine kommen an tRNA gebunden vor (Cohen et al., 1969). Darüberhinaus beeinflussen Polyamine die Aktivität tRNA-modifizierender Enzyme.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, den Gehalt der spezifischen tRNAs an Polyaminen zu bestimmen.

Zunächst wurde versucht zu klären, ob die beobachteten Veränderungen im chromatographischen Verhalten nur die tRNA^{Phe} oder auch andere tRNAs betreffen. Es wurden die tRNA^{Leu} und tRNA^{Arg} ausgewählt. Für tRNA^{Leu} sind in *E. coli* fünf Isoakzeptoren bekannt (Blank und Söll, 1971). Für tRNA^{Leu}_{UUG} wurde in Nachbarstellung zum 3'OH-Ende des Anticodons die gleiche modifizierte Base gefunden, die in tRNA^{Phe} in dieser Position enthalten ist. Die tRNA^{Arg} wurde gewählt, weil sie Regelfunktionen für die Synthese Arginin-spezifischer Enzyme haben könnte, ähnlich der Regulation des His-Operons durch die tRNA^{His}.

3.5. Chromatographisches Verhalten von leu-tRNA^{Leu} und arg-tRNA^{Arg}

Um zu prüfen, ob der Effekt des Arginins auf die tRNA^{Phe} beschränkt ist, oder ob auch andere Species betroffen sind, wurden Proben von jedem isolierten tRNA-Gemisch entweder mit Leucin oder mit Arginin beladen und chromatographisch analysiert.

3.5.1. leu-tRNA^{Leu} aus dem Wildtyp und den Mutanten von E. coli - gezüchtet bei verschiedenen Arginin-Konzentrationen

Wie die Abbildung 8 zeigt, wurden fünf verschiedene Leucin-tRNA-Isoakzeptoren in E. coli RC^{Str} arg⁻ thi⁻ gefunden. Wenn die tRNA der Zellen verwendet wird, die keine Beeinflussung ihrer Phenylalanyl-tRNA durch Arginin zeigten, ist der zweite Gipfel der Leucyl-tRNA nur durch eine Schulter angezeigt. Ein Überschuß an Arginin beeinflusst, wenn auch in geringem Maße, das chromatographische Verhalten der Leucyl-tRNA. Der untere Teil der genannten Abbildung zeigt anstelle der Schulter einen deutlich ausgeprägten Gipfel. Ob es sich bei diesem Gipfel um eine Veränderung der zweiten isoakzeptierenden Leucyl-tRNA handelt, oder ob die Arginin-Behandlung einen neuen Isoakzeptor verursacht, der im Chromatogramm an gleicher Stelle erscheint, kann nicht entschieden werden.

Zwischen den Elutionsprofilen der Leucyl-tRNA von E. coli MRE 600 und der rel⁺-Mutante unter Arginin-Mangel einerseits und der rel⁺- und rel⁻-Mutante unter Arginin-Überschuß andererseits wurden keine Unterschiede gefunden.

3.5.2. arg-tRNA^{Arg} aus E. coli MRE 600 und den Mutanten RC^{Str} und RC^{rel} - gezüchtet bei verschiedenen Arginin-Konzentrationen

Für die Arginin-akzeptierende tRNA der Keime E. coli MRE 600

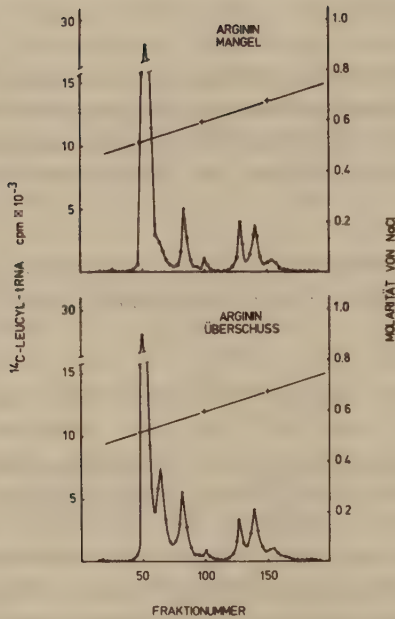


Abb. 8: Chromatographie von leu-tRNA^{Leu} aus E.coli RC^{str} arg⁻thi⁻ entweder gezüchtet mit 10 ug Arginin/ml Medium (obere Abb.) oder gezüchtet mit 60 ug Arginin/ml Medium (untere Abb.) im RPC-5-System

Jeweils 20 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA wurden mit ^{14}C -Leucin - spez. Akt. 110 mCi/mMol - beladen. Die Leucin-Konzentration betrug 2,06 nMol/A₂₆₀. Die chromatographische Trennung erfolgte mit gleicher Methode und gleichen Bedingungen wie sie für die phe-tRNA^{Phe} angegeben ist.

RC^{str} und RC^{rel} wurde ein großer Gipfel im Bereich der Fraktionen 70 - 90, der einer Salzkonzentration von 0,565 M NaCl entspricht, gefunden. Diesem Gipfel war ein sehr kleiner als "Stufe" vorgelagert. Eine bessere Auftrennung hätte sich durch die Verwendung eines flacheren Salzgradienten erreichen lassen. Aber die von Celis und Maas (1971) durchgeführten eingehenden Untersuchungen der gleichen tRNAs unter gleichen Bedingungen machten weitere Chromatographien überflüssig. Die Autoren fanden unter den genannten Bedingungen auch eine für Arginin spezifische tRNA im Elutionsprofil. Sie reicherten diese tRNA aus dem Eluat an und führten eine Rechromatographie mit einem sehr viel flacheren Salzgradienten durch (2 Liter 0,15 M NaCl und 2 Liter 0,25 M NaCl). Sie fanden unter diesen Bedingungen fünf isoakzeptierende Arginyl-tRNAs. Das chromatographische Profil zeigte immer das gleiche Bild, ob die tRNA aus Bakterien mit Repression (Arginin-Überschuß) oder mit Derepression (Arginin-Mangel) gewachsen waren. Eine Oxidation mit Kaliumpermanganat, ein Reagenz, das Isopentenylgruppen abspaltet, blieb in jedem Falle ohne Einfluß auf das Chromatogramm.

In früheren Untersuchungen konnten Leisinger und Vogel (1969) in anderen *E. coli*-Keimen ebenfalls keine Unterschiede im chromatographischen Verhalten der Arginin-spezifischen tRNA unter Bedingungen der Repression und Derepression finden. Die Arginyl-tRNA blieb unbeeinflusst vom Arginin-Gehalt des Mediums.

3.6. Versuche zur Charakterisierung der verschiedenen Typen von tRNA^{Phe}

Um zu prüfen, ob es sich bei Typ I und bei Typ II der tRNA^{Phe} um Isoakzeptoren im Sinne der in der Einleitung gegebenen Definition handelt, wurde versucht, die beiden Typen von tRNA^{Phe} näher zu charakterisieren.

3.6.1. Ausschuß von Artefacten (Fehlbeladungen, Aggregation)

Es wurden tRNA-Präparationen aus E. coli MRE 600-Kulturen, denen entweder 60 µg Arginin pro ml Medium oder ein Aminosäure-Gemisch, das alle Aminosäuren in der gleichen Konzentration (340 µM), aber kein Arginin enthielt, zugesetzt. Die in Tabelle 9 angegebene quantitative Analyse ergab: die unter den verschiedenen Bedingungen gezüchteten Keime enthalten die gleiche Menge tRNA; die Gesamt-tRNA-Population akzeptiert pro A₂₆₀-Einheit gleich viel Phenylalanin; in beiden Fällen werden 95% der angegebenen tRNA-Mengen eluiert; bei Züchtung im Arginin-reichen Medium entfallen 42% der Radioaktivität auf tRNA^{Phe}-Typ I, in Arginin-freiem Medium wurden nur 8% Typ I gefunden. Diese Analyse ist ein Hinweis dafür, daß es sich um eine isoakzeptierende Form von tRNA^{Phe} handelt und nicht um eine Fehlbeladung einer für Phenylalanin unspezifischen tRNA.

Einen weiteren Hinweis dafür, daß eine Fehlbeladung auszuschließen ist, gibt das Ergebnis des folgenden Experimentes: Der normalen Acylierung der Gesamt-tRNA mit ¹⁴C-Phenylalanin ging eine Beladung aller anderen tRNAs mit einem unmarkierten Aminosäure-Gemisch, das kein Phenylalanin enthielt, voraus. Für beide Phenylalanin-spezifischen Isoakzeptoren wurden die Beladbarkeiten der Kontrollen erreicht, die analog, aber ohne Zusatz des Aminosäure-Gemisches behandelt wurden. Die Konzentration jeder Aminosäure im Gemisch betrug 0,5 mM.

In weiteren Versuchen wurden Proben zweier tRNA-Präparationen, von denen jede hauptsächlich nur eine der beiden Typen tRNA^{Phe} enthielt, erhitzt (5 Min. bei 65°C in H₂O), um eventuell entstandene Aggregate zu zerstören. Die anschließenden Co-Chromatographien der erhitzten Proben mit nichterhitzten ergaben völlig identische Elutionsprofile (Yang et al., 1972).

Um zu prüfen, ob sich die beiden Typen der tRNA^{Phe} während der Aminoacylierung zufällig bilden, wurden tRNA-Präparate, die Typ I und Typ II enthielten mit tRNA-Präparaten, die nur

Tabelle 9:

Quantitative Analyse der Verteilung von tRNA^{Phe} Typ I und Typ II in E. coli MRE 600 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Medium- zusatz	isol. tRNA A ₂₆₀ /g	spez. Akt. pMol ¹⁴ C-Phe A ₂₆₀	cpm v. d. Chromato- graphie	cpm n. d. Chromato- graphie	eluierte Radioakt. in %	% Typ I der ges. el. Radioakt.
Arg.	27	30,5	85 680	80 400	94	42
+AS, -Arg	27	31,0	86 700	79 900	93	8

Abkürzungen:

isol. = isolierte; spez. Akt. = spezifische Aktivität der tRNA; v. d. = vor der;
n. d. = nach der; Radioakt. = Radioaktivität; ges. el. = gesamteluierte Radioaktivität
Konzentration der Aminosäuren siehe im Text

Typ II enthielten, in einem Ansatz acyliert und anschließend chromatographiert. Das Elutionsprofil verhielt sich wie die rechnerische Addition nach getrennter Beladung und getrennter Chromatographie.

3.6.2. Co-Chromatographien verschiedener tRNAs

Bei allen beschriebenen Experimenten wurde die Säule mit der gleichen Menge eines tRNA-Gemisches beschickt. Die Arbeitsbedingungen, wie Temperatur, Säulenlänge und Querschnitt sowie die Konzentrationen der Elutionspuffer wurden konstant gehalten. Die RPC-5-Säule zeichnet sich durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Elutionsprofile aus. Kommt es zu Temperaturunterschieden bei verschiedenen chromatographischen Trennungen, wirken sie sich derart aus, daß bei Temperaturerhöhung die tRNAs mit größerer, bei Temperaturerniedrigung die tRNAs mit geringerer Salzkonzentration eluiert werden. Deshalb wurden einige Co-Chromatographien mit ^3H -Phenylalanin- und mit ^{14}C -Phenylalanin-beladenen tRNAs durchgeführt. Die Doppelmarkierung ermöglicht keine quantitative Analyse, sondern nur eine qualitative Aussage. Sie wurde nicht in allen Fällen durchgeführt.

3.6.2.1. Co-Chromatographie von phe-tRNA^{Phe} aus E. coli RC^{rel} nach Arginin-Mangel und phe-tRNA^{Phe} aus E. coli MRE 600

Abbildung 9 zeigt das typische Chromatogramm einer solchen Co-Chromatographie. Das tRNA-Gemisch der rel⁻-Mutante - gezüchtet bei Arginin-Mangel - wurde mit ^{14}C -Phenylalanin acyliert, die tRNA einer Kontrolle von E. coli MRE 600 wurde mit ^3H -Phenylalanin beladen. Beide acylierten tRNA-Gemische wurden an einer RPC-5-Säule analysiert. Das Elutionsprofil zeigt, daß die tRNA^{Phe} Typ II beider Keime in ihrem chromatographischen Verhalten identisch ist, Typ I ist in E. coli MRE 600 nicht vorhanden. Mit Ausnahme des nach Arginin-Mangels auftretenden Typs I von tRNA^{Phe} sind die Elutionsprofile gleich.

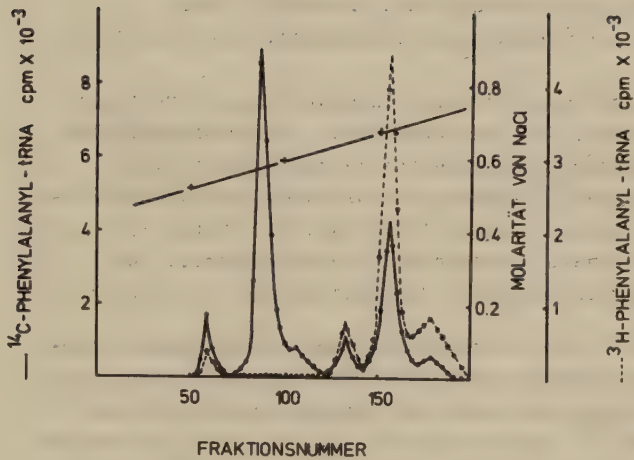


Abb. 9: Co-Chromatographie von phe-tRNA^{Phe} aus *E. coli* RC^{rel} arg⁻thi⁻ - gezüchtet im Argininmangel - mit phe-tRNA^{Phe} aus *E. coli* MRE 600 - gezüchtet unter normalen Bedingungen

20 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA aus *E. coli* RC^{rel} wurden mit ^{14}C -Phenylalanin - spez. Akt. 49,2 mCi/mMol - beladen,
 20 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA aus *E. coli* MRE 600 wurden mit ^3H -Phenylalanin - spez. Akt. 163 mCi/mMol - beladen.

————— ^{14}C -Phenylalanin - - - - - ^3H -Phenylalanin

Co-Chromatographien von tRNA^{Phe} aus *E. coli* RC^{rel} und *E. coli* RC^{str} nach Arginin-Überschuß ergaben auch für Typ I identische chromatographische Eigenschaften.

3.6.2.2. Vergleich von $\text{phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ aus *E. coli* RC^{rel} nach Arginin-Mangel mit $\text{phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ aus *E. coli* MRE 600 nach Chloramphenicol-Behandlung

Eine Behandlung von *E. coli* mit Chloramphenicol führt zur Bildung von tRNAs, die ein verändertes chromatographisches Verhalten gegenüber unbehandelten zeigen (Waters et al., 1973). Für die tRNA^{Phe} werden ein bis zwei neue Isoakzeptoren gefunden (Waters et al., 1973; Mann und Huang, 1973). Ihr relativer Gehalt, bezogen auf den Gesamtgehalt der tRNA^{Phe} , hängt von der Dauer der Chloramphenicol-Wirkung ab.

In *E. coli* RC^{rel} wird unter Arginin-Mangelbedingungen ebenfalls RNA bei gehemmter Proteinsynthese synthetisiert. Die tRNA-Präparationen aus diesen Keimen enthielten auch den Typ I der tRNA^{Phe} . Es wurde geprüft, ob ein nach Chloramphenicol auftretender Isoakzeptor für *E. coli* tRNA^{Phe} im Elutionsverhalten mit dem Typ I von $\text{phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ identisch ist. Abbildung 10 zeigt, daß die tRNA-Präparation aus mit Chloramphenicol behandelten *E. coli*-Bakterien chromatographisch die gleichen Isoakzeptoren der tRNA^{Phe} enthält, wie sie in *E. coli* RC^{rel} unter Arginin-Mangelbedingungen und in *E. coli* RC^{rel} und RC^{str} bei Arginin-Überschuß entstehen.

3.7. Chromatographisches Verhalten von $\text{phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ Typ I und Typ II nach Oxidation mit Jod

3.7.1. Oxidation modifizierter Basen

Isoakzeptierende tRNAs im Sinne der in der Einleitung gegebenen Definition unterscheiden sich entweder in der Basensequenz oder in der Modifikation. tRNAs mit der gleichen Spezifität für eine Aminosäure, aber verschiedenen Modifikationen können im chromatographischen und im chemischen

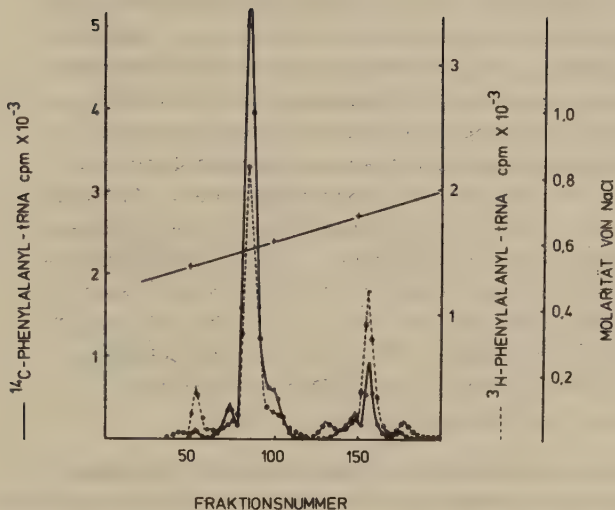


Abb. 10: Co-Chromatographie von CAP behandelter phe-tRNA^{Phe} aus E.coli MRE 600 (—●—●—●—) mit phe-tRNA^{Phe} aus E.coli RC^{rel} - gezüchtet im Argininmangel (---●---●---)

E.coli MRE 600 wurde im normalen Minimalsalzmedium in einer 1 Liter Kultur gezüchtet. Das Chloramphenicol wurde nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase dem Medium zugesetzt (0,9 A₅₇₈, 50 µg CAP/ml). Das CAP wirkte eine Stunde ein. 1,1 g Bakterien wurden erhalten, aus welchen 35 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA isoliert wurden. Die tRNA wurde aus den frischen, nicht eingefrorenen Bakterien isoliert (siehe 2.3.), über eine 1 X 10 cm DEAE-Cellulose-Säule, die vorher mit einem Puffer, der 0,25 M NaCl, 0,01 M Magnesiumacetat und 0,001 M EDTA, pH 4,8 enthielt, aequilibriert wurde, gegeben. Die tRNA wurde mit dem gleichen Puffer, der aber 0,5 M NaCl enthielt, eluiert. Nachdem die tRNA enthaltenden Fraktionen konzentriert, dialysiert und desacyliert waren, wurde die tRNA mit ^{14}C -Phenylalanin - spez. Akt. 98,4 mCi/mMol - beladen. - Die Zucht von E.coli rel⁻ und die Isolierung der tRNA ist in Material und Methoden beschrieben. Die tRNA wurde mit ^3H -Phenylalanin - spez. Akt. 163 mCi/mMol - beladen.

Verhalten differieren. Das trifft insbesondere für die hypermodifizierten Nucleoside zu. Hypermodifizierte Basen sind oft in Nachbarschaft zum 3'OH-Ende des Anticodons zu finden. So enthalten z.B. alle tRNAs von *E. coli*, deren Codons mit U beginnen, an dieser Stelle eine N⁶(Δ²-isopen-tenyl)-2-thiomethyl-adenosin (Nishimura, 1972). Hierbei handelt es sich um ein zweifach modifiziertes Adenosin. Dieser Base soll eine noch nicht genau bekannte Funktion bei der Bindung der tRNA an das Ribosom zukommen; wird sie chemisch verändert, kann die Bindungsfähigkeit der tRNA an Ribosomen abnehmen (Hirsch und Zachau, 1970). Eine schlechtere Bindungsfähigkeit an Ribosomen tritt auch auf, wenn der Adenosin-Rest einer solchen tRNA noch nicht voll modifiziert ist (Geftter und Russel, 1969). Allerdings scheinen sich nicht alle tRNA-Species gleichmäßig zu verhalten (Mann und Huang, 1973; Wettstein et al., 1973).

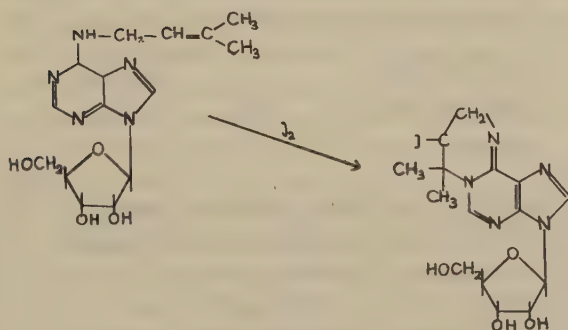
Eine sehr einfache Möglichkeit, einige modifizierte Basen einer tRNA chemisch zu verändern, ist die, sie selektiv zu oxidieren. Dabei werden die Oxidationsmittel und -bedingungen so gewählt, daß die tRNA-Grundstruktur erhalten bleibt und nur die Seitenketten der modifizierten Basen verändert werden. Bei einer oxidativen Behandlung soll nach Möglichkeit nur eine chemische Gruppe, z.B. die SH-Gruppe im Thio-uridin angegriffen werden.

Drei Oxidationsmittel werden verwendet:

- a. Mit Perjodat lassen sich Thiobasen zu Salzen der Sulfonsäure oxidieren (Ziff und Fresco, 1968). Gleichzeitig wird bei der Perjodat-Behandlung der terminale Ribose-ring einer tRNA zwischen zwei benachbarten OH-Gruppen geöffnet, so daß zwei Aldehydgruppen entstehen. Eine so veränderte tRNA ist nach Reduktion mit Bromwasserstoffsäure enzymatisch noch acylierbar (v.d. Haar et al., 1971). Im stark alkalischen Bereich führt dieses Oxidationsverfahren zur hydrolytischen Spaltung der N-glykosidischen Bindungen.

- b. Eine milde Permanganat-Behandlung verursacht eine weniger spezifische Oxidation, je nach Wahl der Bedingungen wird ein tRNA-Molekül mehr oder weniger stark verändert. Nach Hayatsu und Ukita (1967) sollen Pyrimidin-Reste leichter und schneller angegriffen werden. Die Purin-Base N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenosin wird so verändert, daß zu ca. 50% dihydroxyliertes Produkt entsteht und gleichzeitig eine Abspaltung der Seitenkette zu ca. 20% stattfindet (Fittler und Hall, 1966).
- c. Jod reagiert unter milden Bedingungen (pH 7,0; 25°C) schnell mit N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenosin (Robins et al., 1967) und mit 4-Thiouridin (Lipset, 1965), möglicherweise werden auch andere SH-haltige Nucleoside oxidiert. Andere Nucleoside sollen bei dieser Oxidation nicht angegriffen werden.

Aus N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenosin entsteht 7,7-Dimethyl-8-jod-7,8,9-trihydropyrimidin-3-(β -D-ribofuranosyl)(2,1-i-purin) (Robins et al., 1967).



Zahlreiche tRNA-Species aus *E. coli* enthalten zwei Thiouridin-Reste. Durch Jod wird zwischen beiden Thiouridin-Resten eine Disulfid-Brücke gebildet, so daß sich der Abstand zwischen den beiden SH-haltigen Basen verringert und es zu einer Konformationsänderung im Molekül kommt.

Diese Oxidation der SH-Gruppe zur S-S-Doppelbindung ist im Gegensatz zur Oxidation des i⁶A mit Thiosulfat reversibel. Die Akzeptor-Aktivität von tRNA-Isoakzeptoren kann durch Oxidationsmittel unterschiedlich beeinflußt werden, so wurden zwei tRNA^{Lys} isoliert, von denen eine ihre Akzeptor-Aktivität nach Jodoxidation verlor, die andere nicht (Carbon et al., 1965).

Zu den tRNAs von *E. coli*, deren Codons mit U beginnen - die damit ein in C⁶-Position hypermodifiziertes Adenosin in Nachbarschaft zum Anticodon besitzen -, gehören tRNA^{Phe}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Cys}, und tRNA^{Trp}.

Die Reihenfolge der Basen der Codons der Matrizen-Ribonucleinsäuren sind für:

tRNA ^{Phe}	UUU und UUC
tRNA ^{Leu}	UUA und UUG
tRNA ^{Ser}	UCU, UCC, UCA und UCG
tRNA ^{Tyr}	UAU und UAC
tRNA ^{Cys}	UGU und UGC
tRNA ^{Trp}	UGG

Nach früheren Untersuchungen tragen diese tRNAs mit Ausnahme von tRNA^{Leu} und tRNA^{Cys} neben dem N⁶-(4²-isopentenyl)-Rest am C⁶-Atom in C²-Position eine Thiomethylgruppe (Goodman et al., 1968; Harada et al., 1968; Barrell und Sanger, 1969; Nishimura, Yamada und Ishikura, 1969). Nach Rosenberg und Gefter (1969) sollen sich tRNA^{Leu} und tRNA^{Cys} nicht anders verhalten als die anderen tRNA-Species. Bartz et al. (1970) fanden für Phenylalanin aus *E. coli* kein N⁶-(4²-isopentenyl)-2-thiomethyl-adenosin. Yamada et al. (1971) führte diesen Befund darauf zurück, daß die von Bartz

verwendeten Bakterien möglicherweise im letzten Stadium der logarithmischen Wachstumsphase hungerten. Mit ihren 1971 beendeten Untersuchungen konnten sie bestätigen, daß alle *E. coli* tRNAs, die ein Codon, das mit U beginnt, erkennen, ein N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-2-thiomethyl-adenosin (ms²i⁶A) besitzen.

Es sollte geprüft werden, ob Typ I der tRNA^{Phe} ein anderes Oxidationsverhalten gegenüber Jod zeigt als Typ II. Beide tRNA^{Phe}-Typen werden nach der Methode von Fittler und Hall (1969) mit Jod-Jod-Kalium-Lösung oxidiert und anschließend mit dem RPC-5-Verfahren analysiert.

3.7.2. Oxidation von tRNA^{Phe} Typ I

Im Chromatogramm fällt der Gipfel der oxidierten tRNA^{Phe} Typ I mit einem kleinen Gipfel der gleichen nicht oxidierten tRNA-Präparation zusammen. Bei diesem kleinen Gipfel handelt es sich möglicherweise um eine weitere Phenylalanin-isoakzeptierende tRNA, die durch Arginin-Behandlung in *E. coli* rel⁻ und rel⁺ entsteht.

Abbildung 11 zeigt das chromatographische Elutionsprofil von oxidiert und nicht oxidiertem phe-tRNA^{Phe} aus *E. coli*. Die tRNA-Präparation enthielt hauptsächlich nur Typ I von phe-tRNA^{Phe}. Dieser Isoakzeptor wird durch die Jodoxidation so verändert, daß er zwar seine Fähigkeit, Phenylalanin zu akzeptieren (quantitativ), behält, aber bei niedrigerer NaCl-Konzentration eluiert wird als die nicht oxidierte Form. Der oxidierte Typ phe-tRNA^{Phe} enthält insgesamt mehr Radioaktivität als der Umwandlung von Typ I in die oxidierte Form entspricht. Die Analyse der einzelnen Fraktionen ergab, daß ein Teil der Radioaktivität im ersten Gipfel auch durch Oxidation von phe-tRNA^{Phe} Typ II entstehen kann. Die Radioaktivität von phe-tRNA^{Phe} Typ II nimmt von 39% auf 15% ab.

Die Angaben über die Dauer der Jodoxidation schwanken in der Literatur. Wird die tRNA^{Phe} für vier Stunden mit Jod-Jod-

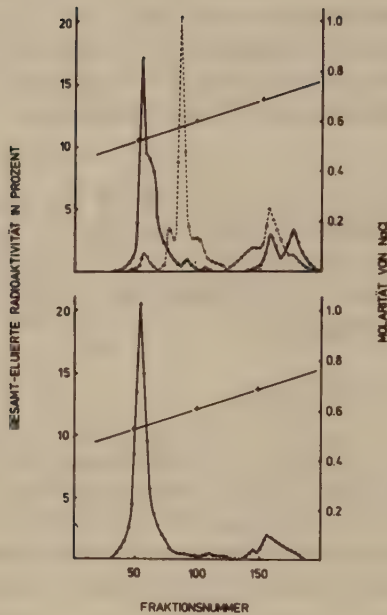


Abb. 11: Vergleich der chromatographischen Eigenschaften von phe-tRNA^{Phe} Typ I (-----) mit der gleichen tRNA, die entweder für 10 min (———, obere Abb.) oder für 4 h (———, untere Abb.) mit Jod oxidiert wurde

Die Oxidation wurde gemäß 2.10. durchgeführt. Wurde für 10 min jodiert, enthielt der Reaktionsansatz 20 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA in 500 µl, wurde für 4 h oxidiert, enthielt der Reaktionsansatz 40 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA in 1000 µl.

Kalium behandelt, werden 50% der tRNA abgebaut. Daraufhin wurde die tRNA nur für 10 Minuten mit Jod behandelt unter sonst gleichen Bedingungen. Es fand kein tRNA-Abbau mehr statt. Carbon et al. (1965) schlagen eine Oxidationsdauer von 15 - 20 Minuten bei 0°C vor. Die Akzeptor-Aktivitäten blieben in jedem Fall erhalten. Abbildung 11a zeigt das chromatographische Verhalten von phe-tRNA^{Phe} nach Behandlung der tRNA mit Jod-Jod-Kalium für 10 Minuten bei 25°C, in Abbildung 11b ist das chromatographische Verhalten nach Oxidation für vier Stunden dargestellt.

Die Veränderungen des chromatographischen Verhaltens der tRNA durch Jodoxidation ist der Behandlungsdauer direkt proportional. Eine Verlängerung der Jodierung über vier Stunden wurde nicht durchgeführt, dürfte aber außer eines weiteren Abbaus der tRNA keine Veränderungen mehr im Elutionsprofil bringen.

3.7.3. Oxidation von tRNA^{Phe} Typ II

Bei der Jodoxidation der tRNA^{Phe} Typ II entsteht nur wenig von der chromatographischen Form, die nach Oxidation von Typ I auftritt. Nach 10-minütiger Oxidation findet sich neben einem Gipfel, der der unveränderten Form (Typ II) entspricht, ein weiterer Gipfel für phe-tRNA^{Phe}, welcher bei höherer Salzkonzentration eluiert wird als Typ II. Nach vier Stunden Oxidation mit Jod von tRNA^{Phe} Typ II und anschließender Chromatographie zeigt das Elutionsprofil vier Gipfel. Der erste Gipfel entspricht im Elutionsverhalten der oxidierten Form des Typs I, der dritte Gipfel dem Typ II von phe-tRNA^{Phe} (Abbildung 12a und 12b).

Der Vergleich der Resultate der Jodoxidation beider tRNA^{Phe}-Typen läßt keinen Zweifel daran, daß zwei verschiedene tRNA-Species vorliegen. Sie unterscheiden sich in ihrer Reaktivität zum oxidierenden Agens, was dadurch bedingt sein könnte, daß sie im Gehalt ihrer mit Jod oxidierbaren Gruppen differieren, oder daß unterschiedliche Modifikationen beider Isoakzeptoren zur unterschiedlichen Zugänglichkeit dieser für

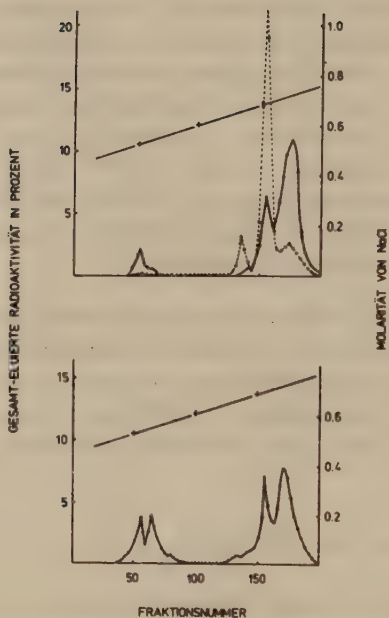


Abb. 12: Vergleich der chromatographischen Eigenschaften von phe-tRNA^{Phe} Typ II (-----) mit der gleichen tRNA, die entweder für 10 min (———, obere Abb.) oder für 4 h (———, untere Abb.) mit Jod oxidiert wurde

Die Oxidation wurde gemäß 2.10. durchgeführt. Wurde für 10 min jodiert, enthielt der Reaktionsansatz 20 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA in 500 µl, wurde für 4 h oxidiert, enthielt der Reaktionsansatz 40 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA in 1000 µl.

das Oxidationsmittel führen. Wie Abbildung 13 zeigt, wird Typ I von phe-tRNA^{Phe} schnell und quantitativ oxidiert, wobei nur ein Oxidationsprodukt entsteht. Dagegen geschieht die Oxidation des Typs II phe-tRNA^{Phe} relativ langsam; sie ist nicht quantitativ und führt zu mehreren Oxidationsprodukten.

3.7.4. Thiouridin-Gehalt der verschiedenen tRNAs

Über die spezifische Absorption des 4-Thiouridins bei 335 nm wurde sein Gehalt in tRNA-Präparationen bestimmt, die entweder hauptsächlich den Typ I oder nur den Normaltyp II enthielten, untersucht. Die Berechnung des Anteils Thiouridin an den Gesamt-Nucleotiden aus dem Verhältnis der Absorption bei 335 nm und bei 260 nm ergab keine Unterschiede für die beiden untersuchten tRNA-Präparationen.

Tab. 10: Thiouridin-Gehalt von Gesamt-tRNA-Präparationen mit Typ I und Typ II phe-tRNA^{Phe}

tRNA- Typ	A ₃₃₅	A ₂₆₀	$\frac{A_{335}}{260}$	$\frac{\text{Mol } s^4\text{U}}{\text{Mol tRNA}}$	$\frac{\text{Mol } s^4\text{U}}{100 \text{ Mol N}}$
I	0.204	10,575	$1,93 \times 10^{-2}$	0,764	0,955
II	0.182	9,590	$1,90 \times 10^{-2}$	0,775	0,968

Abkürzungen: s⁴U = 4-Thiouridin; N = Nucleotide

Für die Berechnung: 1 A₂₆₀ tRNA = 1,66 nMol (Yamada et al., 1971)

1 A₃₃₅ s⁴U = 0,666 nMol (Hall, 1971)

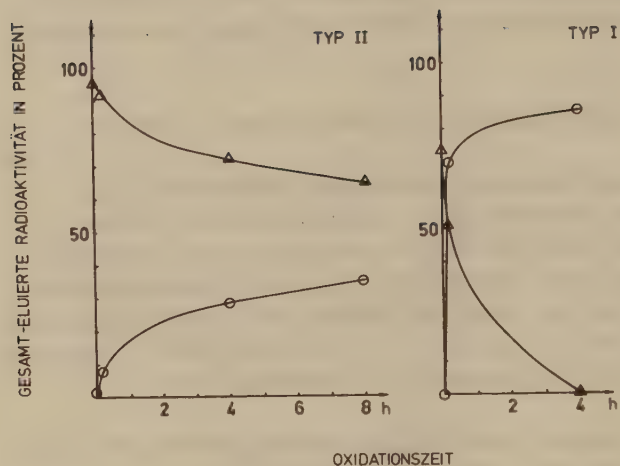


Abb 13: Vergleich der Zu- und Abnahme der oxidierten tRNA ($\triangle$ — $\triangle$) und der nicht oxidierten tRNA ($\circ$ — $\circ$) von Typ II und Typ I in Abhängigkeit von der Oxidationszeit

3.8. Akzeptor-Aktivität

3.8.1. Optimale Testbedingungen

Mit dem Akzeptor-Aktivitäts-Test wurde ein System geschaffen, das es ermöglicht, spezifische tRNAs in vitro mit ihren entsprechenden Aminosäuren zu verestern. Wie für jedes in-vitro-System werden optimale und gut reproduzierbare Testbedingungen gesucht. Für die Acylierung werden die isolierten tRNAs und ein Enzym-Gemisch, das bei der Zellfraktionierung als 100 000 x g (S-100) anfällt, verwendet. Außerdem enthält der Testansatz die radioaktiv-markierte Aminosäure und ATP als Energiequelle. Die richtige Magnesium-Konzentration wird mit dem verwendeten Puffer eingebracht.

Die Beladbarkeit einer tRNA mit ihrer entsprechenden Aminosäure hängt von der Beschaffenheit der tRNA ab. Die Aminosäure wird mit der 2'- oder 3'-OH-Gruppe des terminalen Adenosins einer tRNA verestert. Dieses Adenosin wird mit zwei Cytosin-Basen als sogenanntes CCA-Ende nach der Transkription und der Maturation der tRNA in einer enzymkatalysierten Reaktion an das übrige tRNA-Molekül gebunden. Diese Reaktion ist reversibel. Die Abspaltung des CCA-Endes führt zu einer Verminderung der Akzeptor-Aktivität der tRNA. Die Beladbarkeit einer tRNA mit der spezifischen Aminosäure hängt außerdem von den richtigen Konzentrationsverhältnissen der Reaktionsteilnehmer ab.

Für die Acylierung von Phenylalanin-spezifischer tRNA mit ^{14}C -Phenylalanin wurden folgende optimale Konzentrationen ermittelt:

1. Protein-Konzentration: Wie Abbildung 14a zeigt, genügen von der S-100-Fraktion, die die tRNA-Synthetasen enthält, unter den gegebenen Versuchsbedingungen (siehe Legende) 10 - 20 μg . Abbildung 14b zeigt die Kinetik der Reaktion bei drei verschiedenen Enzym-Konzentrationen. Die Endbeladung ist nach 30 Minuten erreicht. Bei hohen Enzym-Konzentrationen kommt es zu einer Abnahme der Endwerte.

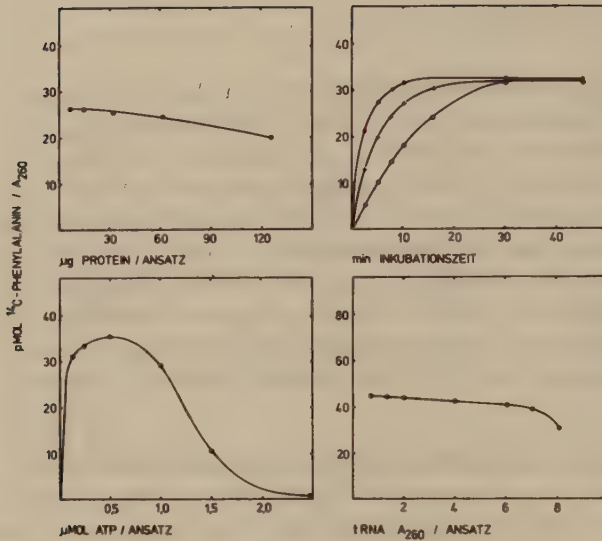


Abb. 14: Abhängigkeit der Beladbarkeit der tRNA^{Phe} von der

- Enzymkonzentration - der 250 μl Ansatz enthielt 2 A_{260} Einheiten tRNA, 0,5 μMol ATP; 30 min Inkubationszeit bei 30°C (Weitere Angaben siehe 2.7.),
- Inkubationszeit - der 250 μl Ansatz enthielt 2 A_{260} Einheiten tRNA, 0,5 μMol ATP, entweder 15 μg S-100 Protein (—●—●—●—) oder 7,5 μg (—*—*—*) oder 3,75 μg (—●—●—●—),
- ATP/ Mg^{++} -Quotient - der 250 μl Ansatz enthielt 2 A_{260} Einheiten tRNA, 15 μg S-100 Protein; Inkubationszeit 30 min bei 30°C ,
- tRNA-Konzentration - der 250 μl Ansatz enthielt 15 μg S-100 Protein, 0,5 μMol ATP,; Inkubationszeit 30 min bei 30°C .

wenn die S-100-Fraktion, so wie sie bei der Zellfraktionierung anfällt, verwendet wird, Ist die S- 100-Fraktion über eine DEAE-Cellulose-Säule gereinigt worden (siehe Material und Methoden), bleiben die Endwerte konstant.

2. ATP-Magnesium-Konzentration: Die Acylierung ist in besonders starkem Maße von dem richtigen Verhältnis zwischen ATP und Magnesium abhängig. Wird die Magnesium-Konzentration konstant gehalten und der ATP-Gehalt variiert, resultiert eine Abhängigkeit der Akzeptor-Aktivität vom ATP-Gehalt des Testansatzes, wie es in Abbildung 14c dargestellt ist. Ein relativ schmaler Bereich optimaler ATP-Konzentration, der für einen Ansatz mit zwei A_{260} Einheiten tRNA zwischen 0,25 und 1,0 μMol liegt, wird beobachtet. Dieser optimale Bereich variiert von Enzym-Rohextrakt zu Enzym-Rohextrakt und muß für jede S-100-Präparation neu ermittelt werden. Wird mit der ATP-Konzentration gleichzeitig die Magnesium-Konzentration erhöht, bleibt die Akzeptor-Aktivität konstant. Durch Verwendung eines energieregenerierenden Systems läßt sich der Akzeptor-Aktivitäts-Test nicht weiter verbessern.

Die Konzentration an tRNA und Aminosäuren entsprechen denen, die in der Literatur (Feldmann et al., 1971; Emmerich et al., 1972; Littauer et al., 1970) angegeben sind. Die Beladbarkeit der tRNA ist im Bereich von 2 - 6 A_{260} Einheiten bei einer Protein-Konzentration von 10 - 20 μg pro Ansatz von der tRNA-Konzentration unabhängig. Alle Versuche wurden mit einer tRNA-Konzentration von 1 - 2 OD pro Ansatz durchgeführt.

Die Testbedingungen, die zur optimalen Beladung führen, sind für jede Aminosäure und ihre spezifische tRNA andere. Am Beispiel des Lysins konnte gezeigt werden, daß viermal mehr S-100-Protein gleicher Präparation zur Erreichung der größten Beladung notwendig ist als für die Acylierung von Phenylalanin-spezifischer tRNA. Für das ATP-Magnesium-Verhältnis ergab sich eine umgekehrte Beziehung. Eine geringere ATP-Menge reichte für die maximale Beladbarkeit aus, ebenso

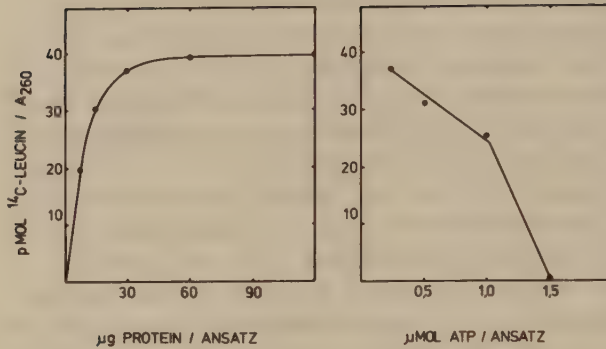


Abb. 15: Abhängigkeit der Beladbarkeit der tRNA^{Leu} von der

- (a) Enzymkonzentration - der 250 μl Ansatz enthielt 2 A₂₆₀ Einheiten tRNA, 0,25 μMol ATP; 30 min Inkubationszeit bei 30°C,
- (b) ATP/Mg⁺⁺-Quotient - der 250 μl Ansatz enthielt 2 A₂₆₀ Einheiten tRNA, 60 μg S-100 Protein; Inkubationszeit 30 min bei 30°C.

wurde eine vollständige Hemmung der Lysin-Akzeptor-Aktivität bei einer ATP-Konzentration gefunden, bei der sich die tRNA^{Phe} noch gut mit Phenylalanin beladen ließ (Abbildung 15a und 15b). Für tRNA^{Ala} wurden noch größere Mengen S-100-Protein benötigt; die Abhängigkeit der Acylierbarkeit vom ATP-Magnesium-Quotienten zeigte große Ähnlichkeit mit der Aminoacylierung von tRNA^{Phe}.

3.8.2. Acylierung von tRNA-Präparationen mit unterschiedlichem Verhältnis von tRNA^{Phe} Typ I und Typ II

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, ist die Aminoacylierung einer spezifischen tRNA in vitro von vielen Faktoren abhängig. tRNA-Gemische, in denen Isoakzeptoren für Phenylalanin in unterschiedlichem Verhältnis vorkommen, könnten verschiedene optimale Testbedingungen verlangen. Außerdem könnten Differenzen in der Kinetik der Veresterungsreaktionen vorhanden sein.

Es wurden die Akzeptor-Aktivitäten der Phenylalanin-spezifischen tRNAs sowohl aus mit Arginin behandelten als auch aus Arginin-Mangel *E. coli* RC^{rel}, RC^{str} und MRE 600 unter den angegebenen Bedingungen geprüft. Frühere Untersuchungen über die Beladbarkeit von tRNAs aus den beiden Arginin-Mutanten rel⁺ und rel⁻ - gezüchtet bei hohen und niedrigen Arginin-Konzentrationen - hatten ergeben, daß sich die tRNAs durch ihre Beladbarkeit mit Phenylalanin und Lysin unterscheiden (Emmerich et al., 1973). Ein unterschiedlicher Polyamin-Gehalt der tRNA-Präparate wurde vermutet. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten tRNAs wurden chromatographisch weiter gereinigt und ihre Beladbarkeit für Phenylalanin getestet. Für die so gereinigten tRNAs konnten keine signifikanten Unterschiede in den Akzeptor-Aktivitäten der verschiedenen tRNA-Präparationen gefunden werden. In der folgenden Tabelle sind die Akzeptor-Aktivitäten aller verwendeten tRNA-Präparationen zusammengestellt.

Tab. 11: Spezifische Aktivität verschiedener tRNA^{Phe}-Präparationen

E. coli spec.	Arginin µg/ml	pMol ¹⁴ C-Phenylalanin A ₂₆₀	Typ II/I in %
RC ^{str} arg ⁻ thi ⁻	10	43, 35	66/ 2
RC ^{str} arg ⁻ thi ⁻	60	30, 35, 23, 34, 27	20/72
RC ^{rel} arg ⁻ thi ⁻	10	34, 29, 31, 30, 30	30/46
RC ^{rel} arg ⁻ thi ⁻	60	30, 30, 31, 35, 28	12/64
MRE 600	-	34, 32	59/ 0

Einschränkend muß zu diesen Ergebnissen gesagt werden, daß es sich nur um orientierende Versuche handelt. Eine Entscheidung darüber, ob die beiden Typen für tRNA^{Phe} sich in ihrer Akzeptor-Aktivität unterscheiden, kann erst dann gefällt werden, wenn die Isoakzeptoren in reiner Form vorliegen.

Im Verlauf dieser Untersuchungen wurde weiter geprüft, ob sich tRNA-Präparationen, die vorwiegend den Typ I oder den Typ II enthalten, dann in ihrer Akzeptor-Aktivität unterscheiden, wenn die Enzym- und ATP-Konzentration variiert wird. Beide tRNA-Typen verhielten sich unter den verschiedenen Testbedingungen gleich.

In den folgenden Versuchen wurde geprüft, ob sich die Kinetik der Acylierungs-Reaktion ändert, wenn tRNA-Präparationen mit vorwiegend Typ I oder vorwiegend Typ II eingesetzt werden. Da die Aminoacylierung von tRNA unter den gegebenen Bedingungen relativ schnell abläuft, wurden die kinetischen Messungen bei einer Temperatur von 24°C durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Kinetik der Acylierungs-Reaktion für tRNA-Präparationen mit unterschiedlichem Gehalt an Typ I und Typ II von tRNA^{Phe} gefunden.

In einer weiteren Untersuchung sollte geprüft werden, ob die relative Zusammensetzung der Gesamt-tRNA durch Arginin beeinflußt wird. Aus der Tabelle 12 ist zu ersehen, daß das Verhältnis der Akzeptor-Aktivität der Phenylalanin-spezifischen tRNA zu den getesteten Aktivitäten anderer Aminoacyl-tRNAs vom Arginin nicht beeinflußt wird. So bleibt z.B. das Verhältnis der Akzeptor-Aktivitäten von Leucin-spezifischen tRNAs zu Phenylalanin-spezifischen tRNAs konstant, ebenso das Verhältnis von Arginin-spezifischen tRNAs zu Phenylalanin-spezifischen tRNAs und auch das Verhältnis von Lysin-spezifischen zu Phenylalanin-spezifischen tRNAs.

Tab. 12: Akzeptor-Aktivitäten verschiedener tRNAs im Verhältnis zur Akzeptor-Aktivität von tRNA^{Phe}

E. coli arg ⁻	Arginin i. Med.	Phe	Leu	Leu Phe	Arg	Arg Phe	Lys	Lys Phe
RC ^{str}	10	43	96	2,21	100	2,31	45	1,16
RC ^{str}	60	30	63	2,10	78	2,60	40	1,33
RC ^{rel}	60	30	64	2,14	80	2,68	35	1,17
MRE 600	-	34	-	-	85	2,50	38	1,12

Jeder 250 µl Ansatz enthielt 2 A₂₆₀ Einheiten Gesamt-tRNA, 0,25 µMol ATP, 17 µg Enzym-Protein, 5 nMol radioaktiv-markierte Aminosäure; genaue Beschreibung siehe Material und Methoden.

Die Akzeptor-Aktivitäten der getesteten spezifischen tRNAs wurden unter denselben Testbedingungen ermittelt. Das bedeutet, daß nicht die, für die entsprechende tRNA optimale ATP- und Enzym-Konzentration eingesetzt wurde, sondern die für Phenylalanin-spezifische tRNA optimalen Bedingungen gewählt wurden.

3.9. Ribosomenbindung

Das Anticodon Phenylalanin-spezifischer tRNA erkennt die Messenger-Triplets UUU und UUC (Nirenberg und Matthaei, 1963; Söll et al., 1967). Für die Bindung an das Ribosom spielt neben diesen drei Basen die dem 3'OH-Ende des Anticodons benachbarte Base eine wesentliche Rolle. Es handelt sich hierbei meistens um modifizierte Basen, z.B. steht an dieser Stelle in allen E. coli tRNA-Molekülen, deren entsprechende Codons mit U beginnen, ein N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-2-thiomethyl-adenosin (Nishimura, 1972).

Um die Bindung verschiedener Aminoacyl-tRNAs an Ribosomen eines bestimmten Organismus miteinander vergleichen zu können, muß der Ribosomenbindungstest standardisiert werden, d.h. die optimalen Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer müssen ermittelt werden. Es ist Voraussetzung, daß es im Ansatz keine Bedingungen gibt, die für die Bindung tRNA/Ribosom zur limitierenden Größe werden können.

3.9.1. Optimale Ribosomen-Konzentration

Es wurde die Ribosomen-Konzentration gesucht, bei der sich 1 A₂₆₀ Einheit tRNA optimal an Ribosomen bindet. Für alle Ribosomenbindungstests wurden Ribosomen von E. coli MRE 600 einer einzigen Präparation verwendet (siehe Material und Methoden). Eine Präparation von Ribosomen enthält noch geringe Mengen endogener mRNA. Um die Bindung von tRNA an endogene mRNA zu testen, wurde in jedem Test ein Kontrollansatz mitgeführt, der keine künstliche mRNA enthielt.

Abbildung 16a zeigt, daß für die maximale Bindung von 1 A₂₆₀ Einheit tRNA von der verwendeten Ribosomen-Präparation mindestens 2 A₂₆₀ Einheiten erforderlich sind.

3.9.2. Optimale Poly-Uridylsäure-Konzentration

Für die unter 3.9.1. ausgetesteten 2 A₂₆₀ Einheiten Ribosomen pro Ansatz wurde die Poly U-Konzentration gesucht, die

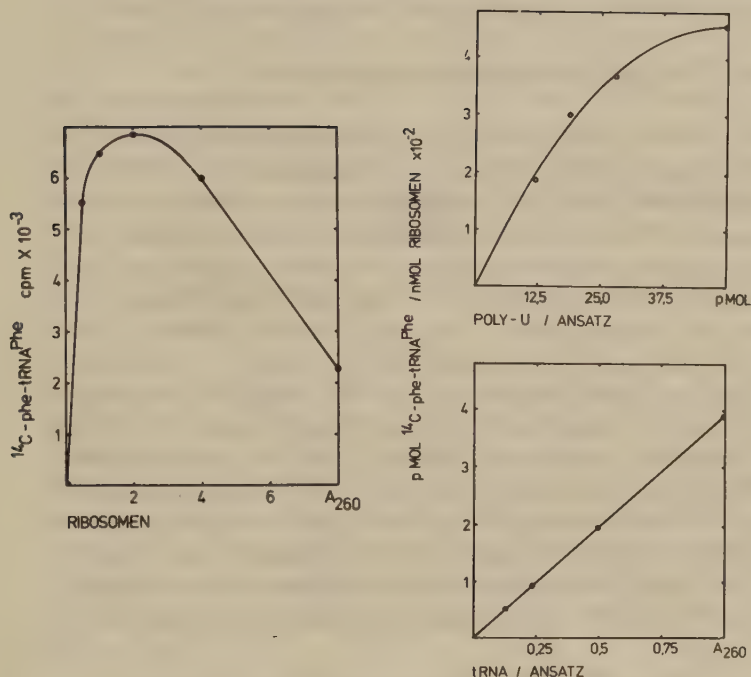


Abb. 16: Abhängigkeit der Ribosomenbindung der phe-tRNA^{Phe} von der

- (a) Ribosomenkonzentration - der 50 μl Ansatz enthielt 1 A_{260} Einheit phe-tRNA^{Phe} = 6900 cpm, 50 pMol Poly U (Weitere Angaben siehe 2.9.),
- (b) Poly U Konzentration - der 50 μl Ansatz enthielt 1 A_{260} Einheit phe-tRNA^{Phe}, 2 A_{260} Einheiten Ribosomen,
- (c) tRNA-Konzentration - der 50 μl Ansatz enthielt 50 pMol Poly U, 2 A_{260} Einheiten Ribosomen.

eine optimale Bindung von tRNA an Ribosomen ergibt, sie betrug 50 μMol pro Ansatz (siehe Abbildung 16b).

3.9.3. ^{14}C phenylalanyl-tRNA-Konzentration

Die verschiedenen tRNAs wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, acyliert. Die Endkonzentrationen an Aminoacyl-tRNAs, die nach chromatographischer Trennung und Einengung des Säuleneluates und Dialyse erhalten werden, lassen sich vor Beginn des Tests nicht exakt ermitteln, weil in der Zeit, die bis zum Erhalten der Ergebnisse vergeht, ein Teil der Aminoacyl-tRNA desacylieren kann. Besteht zwischen der Aminoacyl-tRNA-Konzentration und ihrer Ribosomenbindung eine lineare Beziehung, ist die genaue Kenntnis der spezifischen Beladung der tRNA zum Zeitpunkt des Testbeginns nicht notwendig. Abbildung 16c zeigt, daß für die getesteten tRNA-Konzentrationen eine Linearität zur Ribosomenbindung besteht. Diese Beziehung ist nur so lange linear wie Ribosomen und "Messenger" im Überschuß im Testansatz enthalten sind. In allen Ribosomenbindungstests dieser Untersuchungsreihe wurden nicht mehr als eine A_{260} Einheit eingesetzt.

3.9.4. Bindung von ^{14}C phenylalanyl-tRNA an Ribosomen mit Poly U_2C

Entsprechend dem Poly U-System für die Ribosomenbindung wurden die optimalen Bedingungen für Poly U_2C ausgetestet. Für die Ribosomen-Konzentration und für die lineare Abhängigkeit der Ribosomenbindung von der tRNA^{Phe} -Konzentration ergaben sich keine Unterschiede, wenn anstelle von Poly U Poly U_2C als "Template" benutzt wurde. Die optimale Poly U_2C -Konzentration pro Ansatz betrug 12,5 μg .

3.9.5. Résumé der Optimierungsversuche

Die gefundenen Testbedingungen stimmen mit den Ergebnissen von Nirenberg und Leder (1964) gut überein.

Der Ribosomenbindungstest liefert sehr gut reproduzierbare Ergebnisse. Der methodische Fehler ist sehr klein: aus sechs gleichen Ansätzen wurde ein Variationskoeffizient von 2,06 berechnet. Besondere Aufmerksamkeit muß der Ermittlung der spezifischen Aktivität der tRNAs gewidmet werden. Der Acylierungsansatz wurde für jede tRNA so bemessen, daß eine einmal acylierte tRNA für alle Untersuchungen ausreichte. Für jeden Test wurde in einer Dreifachbestimmung der Gehalt an tRNA und die Radioaktivität neu überprüft.

3.9.6. Codon Response von tRNA^{Phe} aus E. coli RC^{rel} und aus E. coli RC^{str}

Söll et al. (1966 und 1967); Söll und RajBhandary (1967) untersuchten spezifische tRNAs aus E. coli und Hefe auf ihre Fähigkeit, multiple Codons zu erkennen. Aus der Stimulierung der Bindung an den Ribosomen-Matrizen-Komplex konnten sie schließen, daß (1) eine tRNA-Species strikte Spezifität bei der Erkennung des ersten Codebuchstabens zeigt und (2) daß für eine tRNA-Species, die mehrere Codons erkennen kann, der Unterschied im Code-Triplet nur den dritten Buchstaben betrifft.

Wie die Tabelle 13 zeigt, können die einzelnen isoakzeptierenden Aminoacyl-tRNAs entweder alle die gleiche Anzahl verschiedener Codons erkennen oder jeder Isoakzeptor bindet an ein anderes Codon. Söll et al. (1967) beschreibt zwei Isoakzeptoren für tRNA^{Phe} in E. coli, die beide die Codons UUU und UUC erkennen. Für Valin sind in E. coli auch zwei Isoakzeptoren vorhanden, aber der eine Isoakzeptor bindet an die Codons GUU und GUC, der zweite Isoakzeptor für tRNA^{Val} bindet an GUA und GUG.

Tab. 13: Basenfolge der Codons von mRNAs

1st letter	U	C	2nd letter	A	G	3rd letter
	● ● Phe ○	● Ser ○	● ● Tyr ○	Cys	U	
	● ● Phe ○	● Ser ○	● ● Tyr ○	Cys	C	
U	Leu	● Ser ○	Ochre	?	A	
	● Leu	● Ser	Amber	● Trp	G	
	Leu	Pro	His	● Arg ○	U	
	Leu	Pro	His	● Arg ○	C	
C	Leu	● Pro	Gln	● Arg ○	A	
	○ Leu	● Pro	Gln	● Arg	G	
	● ● Ile	Thr	Asn	● Ser	U	
A	● ● Ile	Thr	Asn	● Ser	C	
	Ile	Thr	● ● Lys	Arg ○	A	
	● Met	Thr	● ● Lys	Arg ○	G	
	● Val ○	Ala ○	Asp	● Gly ○	U	
	● Val ○	Ala ○	Asp	● Gly ○	C	
G	● Val ○	● Ala ○	Glu	● Gly ○	A	
	● Val	● Ala	Glu	● Gly ○○	G	

○, Yeast

●, E. coli

nach Söll et al. (1967)

Um die "Codon Response" der unter Arginin-Behandlung auftretenden tRNA^{Phe} gegenüber den bekannten Isoakzeptoren zu prüfen, wurden für die Ribosomenbindung die tRNA-Präparationen ausgewählt, die überwiegend nur einen der beiden Typen enthielten:

1. tRNA von E. coli RC^{rel} arg⁻ thi⁻, der unter maximalem Arginin-Angebot gewachsen war und im chromatographischen Pattern überwiegend den normalen Typ enthielt,
2. tRNA von E. coli RC^{str} arg⁻ thi⁻, der mit minimalem Arginin-Angebot gezüchtet wurde und vorwiegend den neuen Isoakzeptor enthielt.

Tab. 14:

Ribosomenbindungs-Aktivität gegenüber verschiedenen Transfer-Ribonucleinsäuren

E. coli spec.	Arginin µg/ml	Typ II/I	spez. Akt. der tRNA pMol/A ₂₆₀	pMol tRNA im Ansatz	geb. tRNA an Poly U pMol/µMol Rdb.	geb. tRNA an Poly U ₂ C pMol/µMol Rib.	Poly U/ Poly U ₂ C
MRE 600	0	59/ 0	36	20	362	262	1,38
RC ^{rel} arg ⁻ thi ⁻	60	12/64	32	19	360	269	1,34
RC ^{str} arg ⁻ thi ⁻	10	66/ 2	25	19	354	254	1,38

Abkürzungen: spez. Akt. = spezifische Aktivität; gebd. = gebundene

Wie aus der Tabelle 14 ersichtlich ist, ist die Ribosomenbindung mit Poly U und mit Poly U₂C unabhängig von dem Verhältnis, in dem die tRNA^{Phe}-Isoakzeptoren in einer Gesamt-tRNA-Population vorkommen. Auch bleibt das Verhältnis der Bindung mit Poly U einerseits und Poly U₂C andererseits in allen Fällen konstant.

3.10. Protein-Biosynthes in vitro

3.10.1. Optimale Testbedingungen

Wird für die Proteinsynthese in vitro ein Messenger verwendet, der nur für eine Aminosäure codiert, wird in Anwesenheit der entsprechenden tRNA und der entsprechenden Aminosäure ein Peptid gebildet, das nur aus dieser einen Aminosäure zusammengesetzt ist.

Da in dem gebrauchten System (siehe Material und Methoden) das gebildete Peptid mit der tRNA am Ribosom haften bleibt, muß für vergleichende Experimente eine konstante tRNA- und Aminosäure-Menge gewählt werden.

Es wurden Testbedingungen gesucht, die für 5 nMol Phenylalanin und 3 A₂₆₀-Einheiten Gesamt-tRNA eine optimale Bildung von Poly-Phenylalanin ermöglichten. Die Protein-Synthese im Reagensglas ist besonders empfindlich von der Magnesium-Konzentration abhängig. Abbildung 17a zeigt, daß für einen Ansatz, der 5 nMol Phenylalanin enthält, 100 µMol Magnesium den größten Polyphenylalanin-Betrag ergeben. Wird die Magnesium-Konzentration wenig erniedrigt oder erhöht, ist die Polyphenylalanin-Bildung relativ stark gehemmt.

Abbildung 17b zeigt, daß 24 A₂₆₀-Einheiten Ribosomen ausreichend waren für die gewählten tRNA- und Phenylalanin-Konzentrationen.

Für das Polyphenylalanin-synthetisierende System wird für die optimale Poly U-Konzentration das gleiche Phänomen beobachtet, das sich im Ribosomenbindungstest zeigte. Wird der Poly U-Gehalt über einen bestimmten Betrag erhöht - in

diesem Fall 20 µg/Ansatz - wird die Reaktion gehemmt. Die optimalen Testbedingungen ändern sich für jede Ribosomen-Präparation und müssen jedesmal neu ermittelt werden. Es ist ratsam, nur solche Ribosomen-Präparationen zu verwenden, die eine hohe biologische Aktivität zeigen. Mit wenig aktiven Ribosomen lassen sich schlecht reproduzierbare Ergebnisse erreichen.

3.10.2. Polyphenylalanin-Bildung von tRNA-Präparationen
mit unterschiedlichem Verhältnis von tRNA^{Phe}
Typ I und Typ II

Der Ribosomenbindungstest hatte gezeigt, daß die Phenylalanin-spezifischen Isoakzeptoren Typ I und Typ II keine unterschiedliche Ribosomenbindungsfähigkeit besitzen. Beide tRNA-Präparationen, die entweder hauptsächlich den Typ I oder hauptsächlich den Typ II enthielten, wurden im Polyphenylalanin-synthetisierenden System eingesetzt. Abbildung 17d zeigt, daß es während 60 Minuten Testzeit zu keinem signifikant unterschiedlichen Verhalten beider tRNA^{Phe}-Typen kommt. Wurde die Inkubationszeit auf drei Stunden verlängert, konnte das Ergebnis nicht verändert werden.

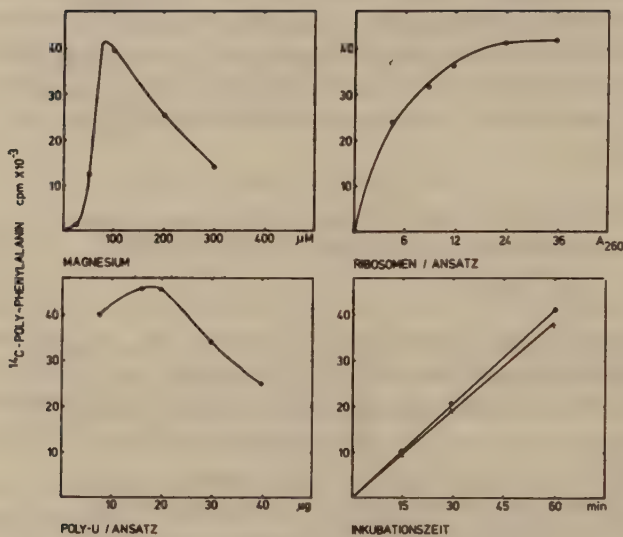


Abb. 17: Abhängigkeit der Poly-Phenylalanin-Bildung von der

- (a) Mg^{++} -Konzentration - der 250 μl Ansatz enthielt 3 A_{260} Einheiten Gesamt-tRNA, 24 A_{260} Einheiten Ribosomen, 20 μg Poly U, 60 min Inkubationszeit (Weitere Angaben siehe 2.8.)
- (b) Ribosomenkonzentration - der 250 μl Ansatz enthielt 3 A_{260} Einheiten Gesamt-tRNA, 100 μMol Mg^{++} , 20 μg Poly U, 60 min Inkubationszeit
- (c) Poly U-Konzentration - der 250 μl Ansatz enthielt 3 A_{260} Einheiten Gesamt-tRNA, 100 μMol Mg^{++} , 60 min Inkubationszeit
- (d) Inkubationszeit - der 250 μl Ansatz enthielt 3 A_{260} Einheiten Gesamt-tRNA, 100 μMol Mg , 20 μg Poly U, 24 A_{260} Einheiten Ribosomen

4. Diskussion

Aus den Resultaten der Untersuchungen zu dieser Arbeit kann geschlossen werden, daß Veränderungen des physiologischen Milieus einer Bakterienzelle zur Änderung ihres Musters an tRNA-Isoakzeptoren führen. Phenylalanin-spezifische tRNA aus einer für Arginin auxotrophen Mutante von *E. coli rel⁻*, die unter Argininmangel gezüchtet wurde, zeigt im Vergleich zur tRNA^{Phe} des sonst isogenetischen *rel⁺*-Stammes ein verändertes Elutionsprofil. Neben dem Gipfel der normalen tRNA^{Phe} wird ein neuer Gipfel gefunden, der mit wesentlich niedrigerer Salzkonzentration von der Säule abzulösen ist. In der *rel⁻*-Mutante ist die strenge Kontrolle zwischen Protein- und RNA-Synthese aufgehoben. Das bedeutet, daß eine Hemmung der Proteinsynthese als Folge des Argininmangels zur Hemmung der RNA-Synthese führt. Es wird daher vermutet, daß die zusätzlich gefundene tRNA^{Phe} nicht vollständig modifiziert ist, weil modifizierende Enzyme fehlen. Ähnliche Beobachtungen machten Wettstein und Stent (1968). Sie verwendeten eine für Leucin auxotrophe Mutante von *E. coli rel⁻* und fanden einen tRNA^{Phe}-Isoakzeptor, der in der isogenetischen *rel⁺*-Mutante unter Bedingungen des Leucinmangels nicht vorkam. Waters et al. (1973) fanden ebenfalls unter Mangel-Bedingungen eine neue tRNA^{Phe} in einer Mutante von *E. coli rel⁻*, die für Phenylalanin auxotroph war.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß tRNA^{Phe}-Isoakzeptoren, die in *E. coli rel⁻arg⁻* nach Argininmangel auftreten, identisch sind mit den tRNA^{Phe}-Isoakzeptoren, die entstehen, wenn die strenge Kontrolle der RNA-Synthese durch Chloramphenicol (CAP) aufgehoben wird. Waters et al. (1973) haben experimentelle Hinweise dafür, daß diese tRNA^{Phe}-Isoakzeptoren in *E. coli* nicht vollständig modifiziert sind. Auch Dijk und Singhal (1974) fanden in *E. coli* 402 nach CAP-Behandlung oder unter Methioninmangel sogar RNA-Precursor-Moleküle, die noch aus ungeschnittenen Transkriptionseinheiten bestehen und nicht modifi-

ziert sind. Diese unterscheiden sich in Größe und Struktur von normaler tRNA. Mit einem Enzymextrakt aus normal gewachsenen Zellen ließen sich diese Vorstufen in tRNAs normaler Größe umwandeln.

Auffallend war, daß nach Zufuhr von Arginin in hohen Konzentrationen zum Nährmedium in *E. coli rel⁻* die neue isoakzeptierende tRNA-Species für Phenylalanin auch gebildet wird. In der *rel⁺*-Mutante tritt nach Zugabe von Arginin zum Medium ebenfalls der neue Isoakzeptor auf. Selbst in Bakterien, die nicht auxotroph für Arginin sind, z.B. *E. coli* MRE 600, findet sich nach Züchtung im argininreichen Medium der neue tRNA^{Phe} Isoakzeptor. Der Effekt ist für Arginin spezifisch, da er durch andere Aminosäuren nicht hervorgerufen werden kann. Danach verursacht Arginin die Akkumulation der tRNA^{Phe}-Species, die in ihren chromatographischen Eigenschaften mit dem tRNA^{Phe}-Isoakzeptor identisch ist, der nach CAP-Behandlung oder nach Entzug der essentiellen Aminosäuren in der *rel⁻*-Mutante entsteht. Vermutlich stellt der unter Arginin-Behandlung gebildete Isoakzeptor der tRNA^{Phe} die gleiche unreife Form dar, die unter CAP-Einfluß synthetisiert wird.

Die quantitative Auswertung der relativen Verteilung der beiden tRNA^{Phe}-Typen in Experimenten, in denen dem Nährmedium von *E. coli* MRE 600 entweder Arginin oder alle Aminosäuren mit Ausnahme des Arginins zugesetzt wurden, gibt einen starken Hinweis dafür, daß in der Bakterienzelle der neue Isoakzeptor in die normale tRNA^{Phe} umgewandelt wird.

Die Tatsache, daß sich die bei Arginin-Mangel in *E. coli* RC^{rel} oder bei Arginin-Überschuß in allen *E. coli*-Stämmen entstandene tRNA^{Phe} in ihrer biologischen Aktivität nicht von der normalen Form unterscheidet, deutet an, daß es sich um eine Änderung des tRNA-Moleküls handeln muß, die für die gemessenen Funktionen (Akzeptor-Aktivität, Ribosomenbindung und Bildung von Poly-Phenylalanin) zumindest in zellfreien Systemen keine wesentliche Bedeutung hat.

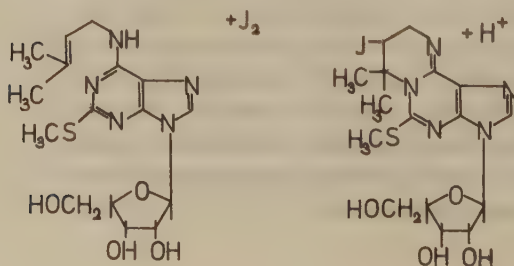
Wettstein und Stent fanden nach Entzug von Eisen-Ionen aus dem Nährmedium die Bildung von ein bis zwei tRNA^{Phe} -Arten, die in ihrem Elutionsmuster mit den Formen der tRNA^{Phe} aus *E. coli* rel^-leu^- - gezüchtet bei Leucin-Mangel - übereinstimmen. Die Zufuhr von Eisen-Ionen bei gleichzeitiger Hemmung der Proteinsynthese mit Chloramphenicol konnte diesen Effekt nicht aufheben. Der Isoakzeptor verschwand jedoch, wenn den Zellen nach Stunden des Mangels wieder eine ausreichende Menge an Eisen-Ionen angeboten wurde. Rosenberg und Gefter (1969) konnten nachweisen, daß Eisen-Ionen zur Synthese der 2-Methylthio-Gruppe am Isopentenyladenosin-Rest, der sich in Nachbarstellung zum 3'OH-Ende des Anticodons befindet, benötigt wird (siehe Anhang 1). Alle tRNA -Species von *E. coli*, die diese Modifikation besitzen (tRNA^{Phe} , tRNA^{Tyr} , tRNA^{Leu} , tRNA^{Ser} , tRNA^{Cys} , tRNA^{Trp}) zeigten mit Ausnahme von tRNA^{Trp} ein verändertes chromatographisches Verhalten, wenn die Bakterien unter Eisenmangel-Bedingungen gezüchtet wurden. Gefter und Russel (1968) isolierten aus $\phi 80 \text{ dsu}^+$ III Phagen infizierten *E. coli*-Zellen (ein Phage, der das Struktur-Gen für Suppressor Tyrosin tRNA trägt) drei isoakzeptierenden Tyrosin-spezifische tRNAs , von denen die mit dem RPC-Verfahren zuerst eluierte ein nicht modifiziertes Adenosin in Nachbarstellung zum Anticodon besaß. Bei der folgenden konnte der Isopentenylrest an diesem Adenosin nachgewiesen werden. Der dritte und zuletzt eluierte Isoakzeptor erwies sich als voll modifiziertes $\text{N}^6\text{-(}\Delta^2\text{-isopentenyl)-2-thiomethyl-adenosin}$.

So wie ein Eisen-Mangel in *E. coli* zur Akkumulation von unreifen, nicht voll modifizierten Tyrosin-spezifischen tRNAs führt, vermuten Mann und Huang (1973), daß die zwei Phenylalanin- tRNA -Typen, die sie zusätzlich zu der normalen Form nach Behandlung der Zellen mit Chloramphenicol fanden, ein spätes Stadium im Maturationsprozeß der tRNA repräsentieren. Sie schlagen ein Modell vor, daß eine Zweistufen-Modifikation eines doppelt modifizierten tRNA -Nucleotids beinhaltet, wobei jede Modifikation eine Veränderung der chromatographischen Eigenschaften der tRNA

bedingt. Phenylalanin-spezifische tRNA gehört zu den tRNA-Species, die ein Anticodon besitzen, das als erste Codon-base ein Uridin erkennt und somit nach Nishimura (1972) in Nachbarstellung zum 3'OH-Ende des Anticodons ein N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-2-thiomethyl-adenosin (ms²i⁶A) enthält.

Vergleichende Betrachtungen der Ergebnisse von Rosenberg und Gefter (1968), Gefter und Russel (1969), Mann und Huang (1973) und Waters (1969 und 1973) lassen vermuten, daß Arginin die Akkumulation von tRNA^{Phe} bewirkt, die an der C²-Position des dem Anticodon benachbarten Adenosins untermodifiziert ist. Die Identität der nach einstündiger CAP-Behandlung auftretenden neuen tRNA^{Phe} mit der durch Arginin bewirkten unterstützt diese Annahme. Die tRNA^{Phe} enthält noch andere modifizierte Basen, aber nur eine zweifach modifizierte, wie sie dem Modell von Mann und Huang (1973) entspricht.

Einen weiteren starken Hinweis dafür, daß sich die beiden Phenylalanin-spezifischen Isoakzeptoren im Modifikationsgrad des N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-2-thiomethyl-adenosins unterscheiden, geben die Ergebnisse der selektiven Oxidation der tRNA mit Jod-Jod-Kalium-Lösung. Der neue Isoakzeptor wird sehr schnell und vollständig zu einer Form oxidiert, die ihre spezifische Akzeptor-Aktivität behält. Die dagegen sehr viel langsamer verlaufende Oxidation der normalen tRNA^{Phe} könnte dadurch erklärt werden, daß die Thiomethyl-Gruppe im Isopentenyladenosin der normalen tRNA^{Phe} den Ringschluß des Isopentenyl-Restes, der während der Jod-Oxidation unter Einbau eines Jodatomes und Freiwerden eines Protones stattfindet, sterisch behindert.



Eine eindeutige Erklärung für das Auftreten von vier Gipfeln im Chromatogramm nach vierstündiger Oxidation der normalen tRNA^{Phe} kann nicht gegeben werden. Möglicherweise kommt es bei längerer Einwirkung von Jod auf tRNA^{Phe} zu einer intermolekularen Wechselwirkung des ⁴Thiouridins eines tRNA-Moleküls mit dem ⁴Thiouridin-Rest einer zweiten tRNA^{Phe} unter Ausbildung einer Disulfid-Brücke und damit eines Dimeren, das im Chromatogramm sowohl der sonst am ms²i⁶A oxidierten als auch der noch nicht am ms²i⁶A oxidierten Form nachläuft. Es ist bisher ungeklärt, ob die Thiomethyl-Gruppe von der Jod-Oxidation mitbetroffen wird (Hall, 1971). Zwar entsteht während der Oxidation des Isopentenyl-Rests ein Proton, das theoretisch in der Lage wäre, eine Thioaetherspaltung der Thiomethyl-Gruppe vorzunehmen, da aber in einem schwach alkalischen Puffer-System gearbeitet wird, ist anzunehmen, daß dieses Proton vom Tris-Puffer abgefangen wird.

Geffer und Russel (1969) zeigten, daß die unvollständig modifizierten Formen von ms²i⁶A (i⁶A oder Adenosin) nicht so wirksam in der Protein-Synthese und in ihrer Ribosomen-Bindungsfähigkeit sind wie normale Tyrosin tRNA, die die voll modifizierte Base enthält. Mann und Huang (1973) konnten zwischen ihren Phenylalanin-spezifischen tRNA-Typen, die sie nach CAP-Behandlung erhielten, und der normalen Form keine Unterschiede in der biologischen Aktivität feststellen. Sie vermuteten, daß sich eine am ms²i⁶A untermodifizierte Phenylalanin tRNA anders verhält als eine genauso beschaffene Tyrosin tRNA. Waters et al. (1973) haben Phenylalanin-, Valin-, Isoleucin- und Lysin-spezifische tRNAs in einem in vitro Hämoglobin-synthetisierenden System eingesetzt und fanden zwischen normaler und "CAP tRNAs", die alle ein stark verändertes chromatographisches Verhalten zeigten, keine Aktivitätsunterschiede. Besonders deutlich hebt sich in ihren Experimenten die Phenylalanin-spezifische tRNA hervor. In den mit CAP behandelten Zellen lagen bis über 60% der tRNA^{Phe} in chromatographisch veränderter Form vor, die sich aber voll aktiv in der Hämoglobin-Synthese verhielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen ebenfalls daraufhin, daß bezüglich der Akzeptor-Aktivität und der Ribosomen-Bindung keine Unterschiede zwischen den beiden Isoakzeptoren für tRNA^{Phe} bestehen, die in E. coli rel⁻ im Arginin-Mangel und in allen untersuchten E. coli-Stämmen entstehen, wenn dem Medium Arginin zugesetzt wird. Die unter Chloramphenicol-Behandlung entstandene neue Form von tRNA^{Phe} ist mit den unter Arginin-Behandlung gebildeten tRNA^{Phe}-Isoakzeptoren chromatographisch identisch. Jedoch können von Chloramphenicol im Vergleich zum Arginin mehr Modifikationen der tRNA in der Bakterien-Zelle beeinflußt werden, denn

1. CAP verändert das chromatographische Verhalten aller getesteten Acyl-tRNAs, auch derer, deren Anticodon ein Codon, das nicht mit U beginnt, erkennt (Waters et al., 1973),
2. CAP senkt den Gehalt an ⁴Thiouridin und Dihydrouridin in einem tRNA-Gesamtgemisch erheblich (Waters et al., 1973). Das Arginin hat auf den Gehalt an ⁴Thiouridin keinen Einfluß, weder in einem getesteten tRNA-Gesamtgemisch noch in teilweise gereinigten und angereicherten Proben der beiden Hauptisoakzeptoren für Phenylalanin, wie sie nach der Arginin-Behandlung gefunden werden. Nach Shugart und Stulberg (1969) und Shugart (1972) soll Dihydrouridin in den Aminoacylierungsprozeß von Phenylalanin eingeschlossen sein. Da die untersuchten tRNAs keine Akzeptor-Aktivitäts-Differenzen zeigten, kann eine Veränderung des tRNA^{Phe}-Moleküls an seinen Dihydrouridin-Basen ausgeschlossen werden.

Die Arginin-Wirkung ähnelt sehr dem Eisenmangel-Effekt. Möglicherweise erniedrigt Arginin selbst oder als Vorstufe für Polyamine den Eisengehalt in der Zelle. Es wird vermutet, daß Arginin die Eisen-Ionen in der Zelle "maskiert" und damit spezifisch nur eine Modifikation von tRNAs inhibiert, nämlich die Einführung der Thiomethyl-Gruppe in die C²-Position des N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenosins durch das eisenabhängige Enzym. Dabei entsteht eine nicht voll

maturierte tRNA^{Phe}. Diese Form der tRNA^{Phe} kann aber auch unter Bedingungen der entkoppelten RNA-Protein-Synthese in *E. coli* rel⁻ auftreten - in Arginin-auxotrophen Stämmen durch Entzug von Arginin - oder bei Aufhebung der strengen Kontrolle durch Chloramphenicol. In diesen Fällen wird durch die verhinderte Proteinsynthese relativ zur RNA-Synthese nicht genügend modifizierendes Enzym nachgeliefert.

Es ist möglich, daß für die Einführung der Thiomethyl-Gruppe zwei Enzyme benötigt werden, aber nur ein Enzym eisenabhängig ist. Für die anderen methylierten Basen konnten Rosenberg und Geiter (1969) unter Bedingungen des Eisenmangels keine Veränderungen im Modifizierungsgrad finden. Das Arginin scheint nicht direkt die Methylierung der Thiomethyl-Gruppe zu beeinflussen, sondern spezifisch auf die Aktivität des Enzyms zu wirken, das die Thiolylierung an der C²-Position des Isopentenyl-adenosins katalysiert. Erst in einem zweiten Schritt würde an dieser Stelle im tRNA-Molekül die Methylierung erfolgen. Die enzymatische Übertragung der Thiomethyl-Gruppe in vitro ist noch nicht gelungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in guter Übereinstimmung mit denen von Chase et al. (1974). Diese Autoren fanden Veränderungen im chromatographischen Verhalten von tRNA^{Phe}, tRNA^{Leu} und tRNA^{Ser} aus Arginin-auxotrophen rel⁻-Mutanten, wenn diese unter Argininmangel-Bedingungen wuchsen. Die beobachteten Isoakzeptoren verhielten sich chromatographisch identisch mit denen, die in *E. coli* unter Chloramphenicol-Behandlung gebildet werden.

Wie Mann und Huang (1973) zeigen konnten, läßt sich eine isoakzeptierende tRNA^{Phe}, die in ihrem chromatographischen Verhalten sowohl der mit Chlroamphenicol als auch der mit Arginin erzeugten Form ähnelt, akkumulieren, indem dem Wachstumsmedium von *E. coli* Phosphat entzogen wird.

Systematische Untersuchungen über das Auftreten von tRNA-Isoakzeptoren unterschiedlichen Modifikationsgrades könnten dazu beitragen, den Biosyntheseweg von modifizierten Basen in tRNAs zu klären und die daran beteiligten Enzyme näher zu studieren.

5. Zusammenfassung

Transfer-Ribonukleinsäuren können neben ihrer Funktion in der Proteinsynthese regulatorische Funktion im Stoffwechsel von Mikroorganismen haben. Für viele Aminosäuren gibt es mehrere spezifische tRNAs als Akzeptoren, die sogenannten tRNA-Isoakzeptoren. Das Muster von tRNA-Isoakzeptoren ändert sich häufig in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zellen.

In Bakterien sind RNA- und Proteinsynthese durch das RC (Ribonucleic Acid Control oder rel) Gen reguliert. Der Entzug der essentiellen Aminosäure führt in Aminosäureauxotrophen rel⁺-Stämmen zum Stillstand der Proteinsynthese, damit gekoppelt hört die RNA-Synthese auf, während in rel⁻-Stämmen RNA weiter synthetisiert wird. Die strenge Kontrolle der RNA-Synthese kann auch durch Inhibitoren, die an Ribosomen angreifen, wie z.B. Chloramphenicol aufgehoben werden. An der strengen Kontrolle der RNA-Synthese sind Ribosomen beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Muster der tRNA-Isoakzeptoren in zwei Mutanten von E. coli (rel⁺ und rel⁻), die auxotroph für Arginin sind, in Abhängigkeit von der Arginin-Konzentration im Medium ändern.

In E. coli rel⁺arg⁻ wurde nach Arginin-Mangel für tRNA^{Phe} nur der tRNA-Akzeptor gefunden, der chromatographisch mit der normalen tRNA^{Phe} aus E. coli Wildstämmen identisch ist. In E. coli rel⁻arg⁻ entstehen unter denselben Bedingungen zwei tRNA-Isoakzeptoren für Phenylalanin. Einer ist chromatographisch identisch mit der tRNA^{Phe}, die in streng kontrollierten (rel⁺) Wildstämmen von E. coli unter dem Einfluß von Chloramphenicol entsteht.

Die Eigenschaften des neuen Isoakzeptors, insbesondere sein Verhalten gegenüber der Oxidation mit Jod, weisen darauf hin, daß dem Isoakzeptor eine spezifische Modifikation an dem zum 3'OH-Ende des Anticodons benachbarten Adenosins fehlt. Die unvollständige Modifikation ließe sich damit erklären, daß bei Aufhebung der strengen Kon-

trolle die gebildete Menge des modifizierenden Enzymes nicht mehr zur Modifikation der tRNA ausreicht.

Auffallend war der Befund, daß auch unter Bedingungen der strengen Kontrolle ein neuer tRNA^{Phe}-Isoakzeptor entsteht, wenn die Zellen bei hohen Arginin-Konzentrationen im Medium gezüchtet wurden. Die Menge des gebildeten Isoakzeptors steigt mit zunehmender Arginin-Konzentration im Medium. Der Effekt ist spezifisch für Arginin und wurde nicht nach Zusatz anderer Aminosäuren zum Medium beobachtet. Dieser tRNA-Isoakzeptor verhält sich chromatographisch und gegenüber der Jod-Oxidation genauso wie der tRNA^{Phe}-Isoakzeptor, der in E. coli nach Aufhebung der strengen Kontrolle der RNA-Synthese gebildet wird.

Alle tRNAs, die ein Codon erkennen, das mit U beginnt, besitzen in Nachbarstellung zum 3'OH-Ende des Anticodons ein zweifach modifiziertes Adenosin, das N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-2-thiomethyl-adenosin. Das modifizierende Enzym, das die Thiomethyl-Gruppe auf das Isopentenyladenosin überträgt, ist ein eisenabhängiges Enzym. Es wird vermutet, daß Arginin oder ein Argininmetabolit, z.B. Polyamine, diesen Modifizierungsschritt beeinflussen, indem Eisen gebunden und damit das Enzym gehemmt wird. Auch nach Eisen-Mangel wurde der Isoakzeptor für tRNA^{Phe} gefunden. Auch eine andere tRNA, die ein Codon, das mit U beginnt, erkennt (tRNA^{Leu}), zeigt ein verändertes Muster ihrer tRNA-Isoakzeptoren, wenn die Zellen in einem Arginin-reichen Medium gezüchtet wurden, während das Muster der tRNA^{Arg}-Akzeptoren unverändert bleibt.

Für die biologischen Aktivitäten der tRNA^{Phe}-Isoakzeptoren wie Akzeptor-Aktivität, Ribosomenbindung und Poly-Phenylalaninbildung wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Auch erkennen beide tRNA-Isoakzeptoren die künstlichen mRNAs mit den Codons UUU und UUC gleich gut.

Literaturverzeichnis:

- Amos, H.; M. Horn - 5-Methyl-cytosine in the RNA of
Escherichia coli - Biochim. biophys. Acta 29 (1958)
444 - 445
- Apgar, J.; R.W. Holley; S.H. Merrill - Purification of
Alanine-, Valine-, Histidine- and Tyrosine-acceptor
Ribonucleic Acids from Yeast - J. Biol. Chem. 237
(1962) 796 - 802
- Arlinghaus, R.; J. Shaeffer; R. Schweet - Mechanism of
Peptide Bond Formation in Polypeptide Synthesis
- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51 (1964) 1291 - 1299
- Arnold, H. - Dissertation 1973
- Avital, S.; D. Elson - A convenient Procedure for Prepa-
ring Transfer Ribonucleic Acid from E. coli
- Biochim. biophys. Acta 179 (1969) 297 - 307
- Barrell, B.G.; F. Sanger - The Sequence of Phenylalanine
tRNA from E. coli - Febs Letters 3 (1969) 275 - 278
- Bartz, J.; D. Söll; W.J. Burrows; F. Skoog - Identification
of the Cytokinin-Active Ribonucleosides in Pure
Escherichia coli tRNA Species - Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S. 67 (1970) 1448 - 1453
- Borek, E.; A. Ryan; J. Rockenbach - Nucleic Acid Metabolism
in Relation to the Lysogenic Phenomenon - J. Bacteriol.
69 (1955) 460 - 467
- Baoley - Tech. und Prot. Chem. (1967)
- Campbell, B.N.; J.R. Sargent - Techniques in Protein
Biosynthesis - Acad. Press. London, New York, Vol. 1
(1967), Vol. 2 (1969)
- Chambers, R.W. - The Chemistry of Pseudouridine
- Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol. 5 (1966)
349 - 398
- Capra, J.D.; A. Peterkofsky - Effect of in vitro Methylation
on the Chromatographic at Coding Properties of Methyl-
deficient Leucin Transfer RNA - J. Mol. Biol. 33
(1968) 591 - 607
- Carbon, J.A.; L. Hung; D.S. Jones - A Reversible Oxidative
Inactivation of Specific Transfer RNA Species
- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 53 (1965) 979 - 986
- Chase, R.; G.M. Tener; J.C. Gillam - Changes in Levels of
Amino Acid Acceptors in tRNA from Escherichia coli
Grown under Various Conditions - Archives of Biochem.
and Biophys. 163 (1974) 306 - 317
- Celis, T.F.R.; W.K. Maas - Studies on the Mechanism of
Repression of Arginine Biosynthesis in Escherichia
coli - J. Mol. Biol. 62 (1971) 179 - 188

- Cherayil, J.D.; R.M. Bock - A Column Chromatographic Procedure for the Fractionation of sRNA
- Biochemistry 4 (1965) 1174 - 1183
- Cohen, S.S.; S. Morgan; E. Streibel - The Polyamine Content of the tRNA of *E. coli* - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 64 (1969) 669 - 676
- Dijk, J.; R.P. Singhal - Precursor Molecules of Transfer Ribonucleic Acids in *Escherichia coli* - J. Biol. Chem. 249 (1974) 645 - 648
- Doctor, B.P.; J. Apgar; R.W. Holley - Fractionation of Yeast Amino-acid-acceptor Ribonucleic Acids by Countercurrent Distribution - J. Biol. Chem. 236 (1961) 1117 - 1120
- Doctor, B.P., Ph.D.; M.J. Fournier, Ph.D.; Ch. Thornsvarð, M.D. - The Effect of Polyamines on the Aminoacylation of tRNA - Ann. N.Y.A. Sci. 171 (1970) 863
- Dunn, D.B.; J.D. Smith; P.F. Spahr - Nucleotide Composition of Soluble Ribonucleic Acid from *Escherichia coli* - J. Mol. Biol. 2 (1960) 113 - 117
- Ehrenstein, G.; D. Dais - A Leucine Acceptor sRNA with Ambiguous Coding Properties in Polynucleotide - Stimulated Polypeptide Synthesis - Proc. Nat. Acad. Sci. 50 (1963) 81 - 86
- Emmerich, B.; B. Goertz; H. Kersten - Biological Properties of Transfer RNA, Synthesized during Arginine Deprivation in Stringent and Relaxed Auxotroph Strains of *Escherichia coli* - Febs Letters 21 (1972) 244 - 247
- Feldmann, H.; H. Harring; H. Gruhl - Methionine Specific Transferrribonucleic Acids from Brever's Yeast and a Haploid Strain - Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 (1971) 1231 - 1247
- Fittler, F.; R.H. Hall - Selective Modification of Yeast Seryl-tRNA and its Effect on the Acceptance and Binding Functions - Biochem. Biophys. Res. Commun. 25 (1966) 441 - 467
- Fleißner, E.; E. Borek - A New Enzyme of RNA Synthesis; RNA Methylase - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 48 (1962) 1199 - 1203
- Fuller, W.; A. Hodgson - Conformation on the Anticodon Loop in tRNA - Nature 215 (1967) 817 - 821
- Gefter, M.; R.L. Russel - Role of Modifications in Tyrosine tRNA: A Modified Base Affecting Ribosome Binding - J. Mol. Biol. 39 (1969) 145 - 157
- Gillam, I.; S. Millward; D. Blew; M.V. Tigerstrom; E. Wimmer; G.M. Teener - The Separation of Soluble Ribonucleic Acids on Benzoylated Diethylaminoethylcellulose - Biochem. 6 (1967) 3043 - 3056

- Gillam I.C.; G.M. Teener - The Use of BD-Cellulose in Separating Transfer RNAs - Methods in Enzymology Vol XX(c) (1971) 55 - 70
- Goldstein, J.; T.P. Bennett; L.C. Craig - Countercurrent Distribution Studies of *Escherichia coli* B sRNA - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51 (1964) 119 - 125
- Goodman, H.M.; J. Abelson; A. Landy; S. Brenner; J.D. Smith - Amber Suppression: A Nucleotide Change in the Anticodon of a Tyrosine Transfer RNA - Nature 217 (1968) 1019 - 1024
- v.d. Haar, F.; ;. Schlimme; M. Gomez-Guillen; F. Cramer - Substrate Properties of Yeast tRNA^{Phe} Oxidized and Reduced at the 3'-Terminal Ribose - Eur. J. Biochem. 24 (1971) 296 - 302
- Hall, R.H. - The Modified Nucleosides in Nucleic Acids - New York, London, 1971
- Harada, F.H.; H.J. Gross; F. Kimura; S.H. Chang; S. Nishimura; U.L. RayBhandary - 2-Methylthio N⁶-(2-Isopentenyl)-Adenosine: A Component of *Escherichia coli* Tyrosine Transfer RNA - Biochem. Biophys. Res. Com. 33 (1968) 299 - 306
- Hayward, R.S.; S.B. Weiss - RNA Thiolas: The Enzymatic Transfer of Sulfur from Cysteine to sRNA in *Escherichia Coli* Extracts - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 55 (1966) 1161 - 1168
- Hayatsu, H.; T. Ukita - The Selective Degradation of Pyridine in Nucleic Acids by Permanganate tRNA - Biochem. Biophys. Res. Commun. 29 (1967) 556 - 561
- Hentzen, D.; P. Mandel; J.P. Garel - Relation between Aminoacyl-tRNA Stability and the Fixed Aminoacid - Biochim. Biophys. Acta 281 (1972) 228 - 232
- Hirsch, R.; H.G. Zachau - Studies on Jodination of Serine Specific Transfer Ribonucleic Acid - Hope - Seyler's A. Physiol. Chem. 351 (1970) 563 - 556
- Hurwitz, J.; M. Gold; M. Anders - The Enzymatic Methylation of Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid - J. Biol. Chem. 239 (1964) 3462 - 3473
- Jakobson, K.B. - Role of Isoacceptor Transfer Ribonucleic Acid as an Enzyme Inhibitor: Effect on Tryptophane Pyrrolase of *Drosophila* - Letters to Nature from Nature New Biology 231 (1971) 17 - 19
- Kaji, A. - Techniques for Measuring Specific sRNA Binding to *Escherichia Coli* Ribosomes - Methods in Enzymology 12 (1968) 692 - 699
- Kaji H.; A. Kaji - Specific Binding of sRNA with the Template-Ribosome Complex - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 52 (1964) 1541 - 1547

- Kawada, Y.; T. Oakmoto; Y. Yamamoto - Fractionation of Soluble RNA by Chromatography on DEAE Ion Exchangers (In Techniques of Nucleic Acid Fractionation) - Biochem. Biophys. Res. Commun. 10 (1963) 200 - 203
- Kelmers, A.D.; G.D. Novelli; M.P. Stulberg - Separation of Transfer Ribonucleic Acid by Reverse Phase Chromatography - J. Biol. Chem. 240 (1965) 3979 - 3983
- Kersten, H.; P.R. Chandra; W. Tanck; W. Wiedenhover - Effect of Pactamycin on Methylation of RNA and Protein Synthesis - Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 659 - 663
- Khym, J.X. - Partition of Transfer Ribonucleic Acid between Aqueous Salt Solutions and Trichlorfluoroethane Containing a Quarternary Amine - J. Biol. Chem. 241 (1966) 4529 - 4553
- Lazzarini, R.A.; A.E. Dahlberg - The Control of Ribonucleic Acid Synthesis during Amino Acid Deprivation in Escherichia coli - J. Biol. Chem. 246 (1971) 420 - 429
- Leboy, P.S. - Stimulation of Soluble Ribonucleic Acid Methylase Activity by Polyamines - Biochemistry 9 (1970) 1577 - 1584
- Lederberg, J.; E.M. Lederberg - Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants - J. Bact. 63 (1952) 399 - 406
- Leisinger, Th.; H.J. Vogel - Repression by Arginine in Escherichia coli: A Comparison of Arginyl Transfer RNA Profiles - Biochim. Biophys. Acta 182 (1969) 572 - 574
- Lipsett, M.N. - The Isolation of 4-Thiouridylic Acid from the Soluble Ribonucleic Acid by Escherichia coli - J. Biol. Chem. 240 (1965) 3975 - 3978
- Lipsett, M.N.; A. Peterkofsky - Enzymatic Thiolation of E. coli sRNA - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 55 (1966) 1169 - 1174
- Littauer, U.Z.; N. Biezunski; D. Givon - Purification and Properties of Escherichia coli Methyl-Deficient Phenylalanine tRNA - Biochim. Biophys. Acta 199 (1970) 382 - 393
- Littlefield, J.W.; D.B. Dunn - The Occurrence and Distribution of Thymine and Three Methylated-Adenine Bases in Ribonucleic Acids from Several Sources - Biochim. J. 70 (1958) 642 - 651
- Mann, B.; P.C. Huang - Behavior of Chloramphenicol - Induced Phenylalanine Transfer Ribonucleic Acid during Recovery from Chloramphenicol - Biochemistry 12 (1973) 5289 - 5293
- Mann, M.B.; P.C. Huang - New Chromatographic Form of Phenylalanine Transfer Ribonucleic Acid from Escherichia coli Growing Exponentially in an Low-Phosphate Medium - J. Bacteriology 118 (1974) 209 - 212

- Mans, R.J.; G.D. Novelli - A Convenient, Rapid and Sensitive Method for Measuring the Incorporation of Radioactive Amino Acids into Protein - Biochem. Biophys. Res. Commun. 3 (1960) 540 - 543
- Muench, K.H.; P. Berg - Fractionation of Transfer Ribonucleic Acid by Fractional Partition Chromatography on Sephadex Columns
- Muench, K.H.; P.A. Saffille - Transfer Ribonucleic Acids in *E. coli* - Multiply and Variation - Biochemistry 7 (1968) 2799 - 2808
- Nirenberg, M.; Ph. Leder - RNA Codewords and Protein Synthesis - The Effects of Trinucleotides upon the Binding of sRNA to Ribosomes - Science 145 (1964) 1399 - 1407
- Nirenberg, M.W.; J.H. Matthaei - Characteristics and Stabilisation of DNA ASE - Sensitive Protein Synthesis in *E. coli* Extracts - Proc. Nat. Acad. Sci. 47 (1961) 1580 - 1588
- Nishimura, S. - Fractionation of Transfer RNA by DEAE-Sephadex A-50 Column Chromatography - Proc. in Nucleic Acid Res. 2 (1971) 542 - 563
- Nishimura, S. - Minor Components in Transfer RNA: Their Characterisation, Location and Function - Prog. Acid Res. Mol. Biol. 12 (1972) 49 - 85
- Nishimura S.; F. Harada; V. Narushima; T. Seno - Purification of Methionine-, Valine-, Phenylalanine- and Tyrosine-Specific tRNA from *Escherichia coli* - Biochim. Biophys. Acta 142 (1967) 133 - 148
- Nishimura, S.; J.B. Weinstein - Fraction of Rat Liver Transfer Ribonucleic Acid-Isolation of Tyrosine, Valine, Serine and Phenylalanine Transfer Ribonucleic Acids and their Coding Properties - Biochemistry 8 (1969) 832 - 842
- Nishimura, S.; Y. Yamada; H. Ishikura - The Presence of 2-Methylthio-N⁶-(2-isopentenyl)-Adenosine in Serine Phenylalanine Transfer RNAs from *Escherichia coli* - Biochim. Biophys. Acta 179 (1969) 517 - 520
- Pearson, R.L.; A.D. Kelmers - Separation of Transfer Ribonucleic Acids by Hydroxyapatite Columns - J. Biol. Chem. 241 (1966) 767 - 769
- Pearson, R.L.; J.F. Weiss; A.D. Kelmers - Improved Separation on Transfer RNAs on Polychlorotrifluoroethylene-Supported Reversed-Phase Chromatography Columns - BBA 228 (1971) 770 - 774
- Pegg, A.E. - The Effect of Diamines and Polyamines on Enzymatic Methylation of Nucleic Acid - Biochim. Biophys. Acta 232 (1971) 630 - 642
- Robins, M.J.; R.H. Hall; R. Thedford - N⁶-(2-Isopentenyl) Adenosine. A Component of the Transfer Ribonucleic Acid of Yeast and of Mammalian Tissue, Methods of Isolation and Characterization - Biochemistry 6 (1967) 1837 - 1848

- Rosenberg, A.H.; M.L. Gefter - In Iron-Dependent Modification of Several Transfer RNA Species in *Escherichia coli* - J. Mol. Biol. 46 (1969) 581 - 584
- Siegel, H. - Metal-Ions in Biolog. Systems - Marcel Dekker, Inc. New York, 1973
- Singer, C.E.; G.R. Smith; R. Cortese; B.N. Ames - Mutant tRNA^{His} Ineffective in Repression and Lacking Two Pseudouridine Modifications - Nature 238 (1972) 72 - 74
- Shugart, L.; M.P. Stulberg - Borohydride Reduction of Phenylalanine Transfer Ribonucleic Acid - J. Biol. Chem. 244 (1969) 28P6 - 2808
- Shugart, L. - Effect of Selective Chemical Modification of 4-Thiouridine of Phenylalanine Transfer Ribonucleic Acid on Enzyme Recognition - Arch. Biochem. Biophys. 148 (1972) 488 - 495
- Söll, D.; D.S. Jones; E. Ohtsuka; R.D. Faulkner; R. Lohmann; H. Hayatsu; H.G. Khorana; J.D. Cherayil; A. Hampel; R.M. Bock - Specificity of sRNA for Recognition of Codons as Studied by the Ribosomal Binding Technique - J. Mol. Biol. 19 (1966) 556 - 573
- Söll, D.; U.L. RajBhandary - Studies on Polynucleotides-LXXVI - Specificity of Transfer RNA for Codon Recognition as Studied by Amino Acid Incorporation - J. Mol. Biol. 29 (1967) 97 - 112
- Spurides, G.J. - The Effect of Univalent Cations on the Binding of sRNA to the Template-Ribosome Complex - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51 (1964) 1220 - 1226
- Steward, P.R.; D.S. Letham - The Ribonucleic Acids - Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1973
- Thiebe, R.; H.G. Zachau - Zur Fraktionierung der löslichen Ribonucleinsäuren - Biochim. Biophys. Acta 103 (1965) 568 - 578
- Waters, L.C. - Altered Chromatographic Properties of tRNA from Chloramphenicol Treated *Escherichia coli* - Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 (1969) 296 - 304
- Waters, L.C.; L. Shugart; W.-K. Yang; A.N. Best - Some Physical and Biological Properties of 4-Thiouridine- and Dihydrouridine-Deficient tRNA from Chloramphenicol Treated *Escherichia coli* - Arch. of Biochem. Biophys. 156 (1973) 780 - 793
- Weiss, S.J.; J. Legault-Demare - Science 149 (1965) 429 -
- Wettstein, F.O.; G.S. Stent - Physiologically Induced Changes in the Property of Phenylalanine tRNA in *Escherichia coli* - J.Mol. Biol. 38 (1968) 25 - 40

- Yamada, Y.; S. Nishimura; H. Ishikura - The Presence of 2-Methylthio-N⁶-(2-Isopentenyl)Adenosine in Leucine, Tryptophane and Cystine tRNAs from Escherichia coli - BBA 247 (1971) 170 - 174
- Yang, W.K.; G.D. Novelli - Isoaccepting tRNAs in Mouse Plasma Cell Tumors that Synthesize Different Myeloma Protein - Biochim. Biophys. Res. Commun. 31 (1968) 534 - 539
- Yang, S.K.; D.G. Söll; D.M. Crothers - Properties of a Dimer of tRNA^{Tyr}₁ (E. coli) - Biochemistry 11 (1972) 2311 - 2320
- Ziff, E.B.; J.R. Fresco - Chemical Transformation of 4-Thiouracil Nucleosides to Uracil and Cytosine Counterparts - J. of the American Chem. Society 90 (1968) 7338 - 7342

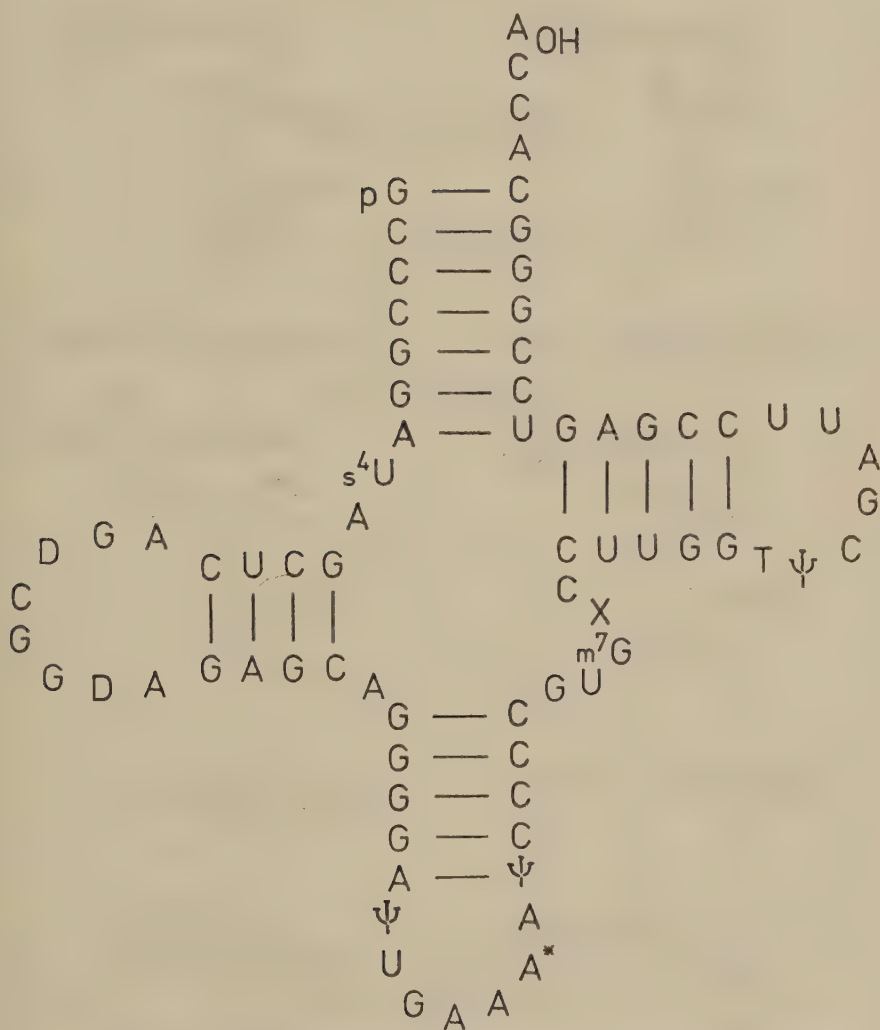
An dieser Stelle möchte ich Frau Professor Dr. H. Kersten herzlich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation danken. Außerdem möchte ich ihr für die freundliche Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. W. Kersten für die vielen wertvollen Diskussionen.

Frau B. Böcker und Frau R. Spilarewicz danke ich besonders für die technische Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Mit den Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit begann
ich unter der Leitung von Frau Prof. Dr. H. Kersten im
Januar 1972 am Physiologisch-Chemischen Institut der
Universität Erlangen-Nürnberg.

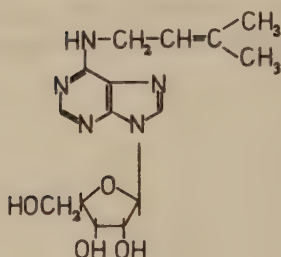
E.coli tRNA^{Phe}



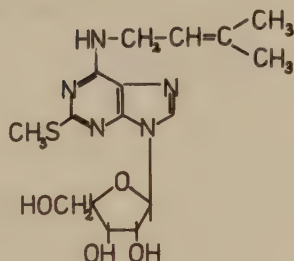
X = 3-amino-3-carboxy-propyl-Uridin (Nishimura, FEBS Meeting, 1974)

A = N⁶-(Δ²-isopentenyl)-2-thiomethyl-Adenosin

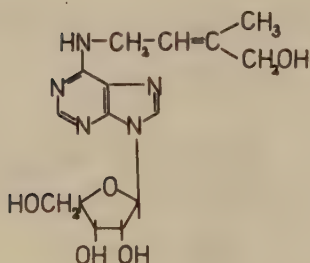
N⁶-(Δ²-Isopentenyl)adenosin



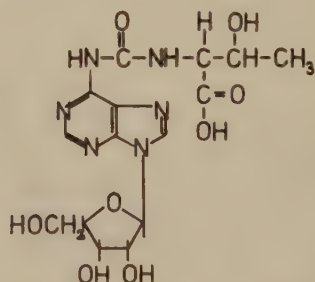
N⁶-(Δ²-Isopentenyl)-2-thio-methyladenosin



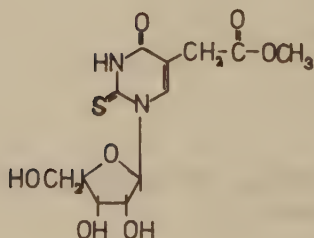
N⁶-(cis-4-Hydroxy-3-methyl-2-enyl)adenosin



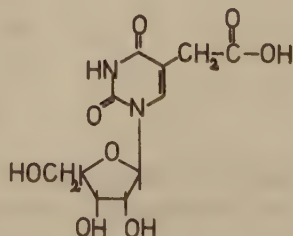
N-(Nebularin-6-ylcarbamoyl)-L-threonin



Methyl,2-thio-5-carboxy-methyluridin



5-Carboxymethyluridin

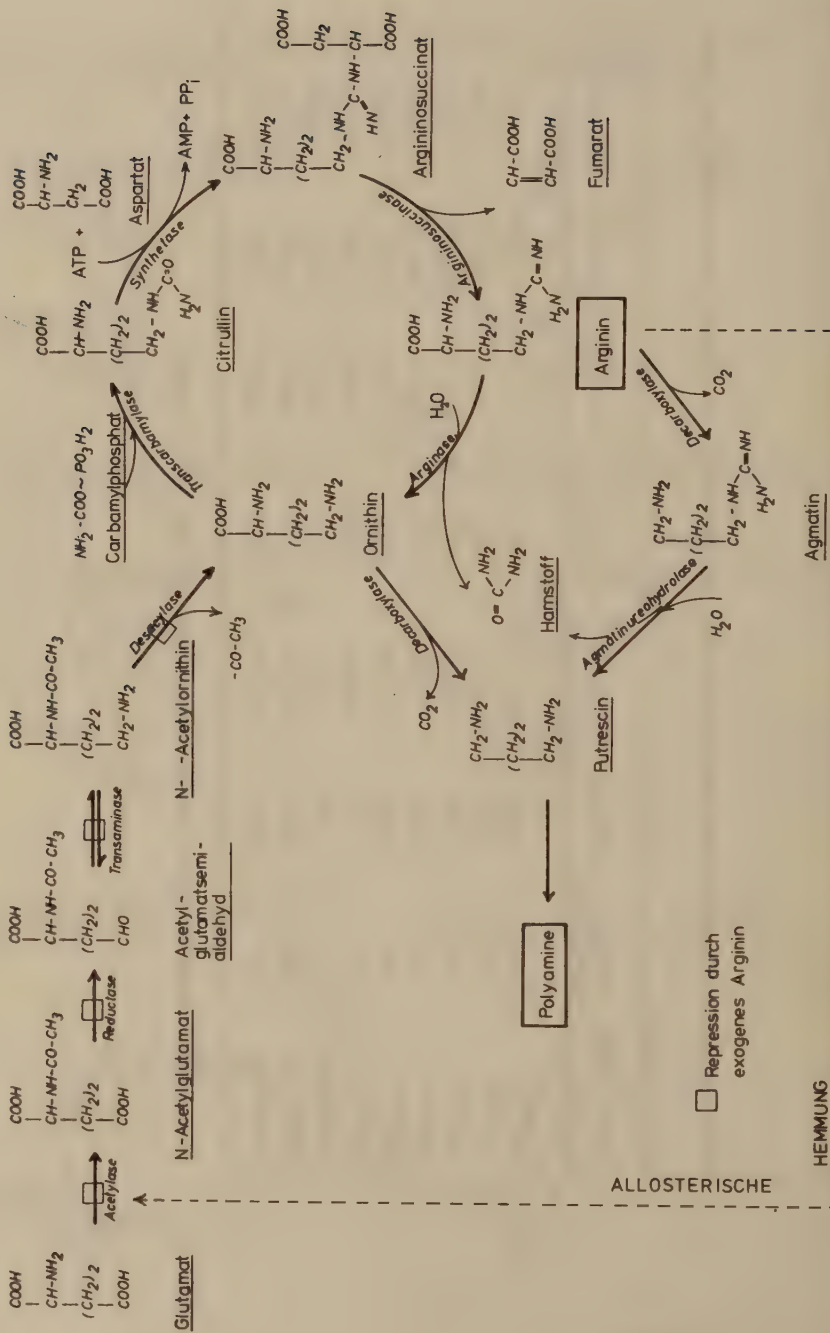


Relative Verteilung der einzelnen tRNA-Typen in Prozent der gesamteluierten Radioaktivität

E.coli Stamm	Arginin µg/ml Med.	Typ I ₀	Typ I	Typ I _a	Typ II ₀	Typ II	Typ II _a
RC ^{rel}	60	9,09	63,60	10,84	2,04	11,51	0,0
RC ^{str}	60	0,75	71,53	5,57	3,35	20,45	3,39
RC ^{rel}	10	6,83	45,70	5,21	4,83	29,60	6,99
RC ^{str}	10	0,44	1,94	0,0	10,94	66,22	19,96
RC ^{str}	20	0,52	25,03	5,07	7,12	52,78	8,55
RC ^{str}	100	1,11	69,20	6,09	2,85	21,32	4,02
MRE 600	0	1,52	0,0	0,0	8,66	58,80	27,93
MRE 600	60	2,17	42,39	3,03	6,60	34,05	7,34
MRE 600	0 ⁺	0,0	8,10	0,0	7,62	67,88	16,40

⁺ alle Aminosäuren in einer Konzentration von 350 µM, kein Arginin

SYNTHESEWEG DES ARGININS IN E. coli



Lebenslauf

Ich wurde am 10. September 1940 in Berlin-Friedrichsfelde geboren.

Am 1. September 1946 begann meine achtjährige Grundschulausbildung, die ich 1954 mit der Abschlußprüfung für Grundschüler beendete.

Im September 1954 trat ich in das Institut für Lehrerbildung in Berlin-Köpenick ein und legte im Frühjahr 1958 die Prüfungen zum Staatsexamen für Unterstufen-Lehrer ab.

Im gleichen Jahr meldete ich mich zur Erlangung der Mittleren Reife an der Volkshochschule Berlin-Lichtenberg an. Das Zeugnis der Mittleren Reife erhielt ich im Juni 1959.

Im August des gleichen Jahres siedelte ich in die Bundesrepublik Deutschland um.

Im Sommer 1960 trat ich in den laufenden Lehrgang des Abendgymnasiums Gießen ein, wo ich im Rahmen einer externen Prüfung 1963 das Zeugnis der Reife erhielt.

Im Sommer-Semester 1963 begann ich mein Studium in den Fächern Chemie, Biologie und Physik an der Justus-Liebig-Universität in Gießen. An der gleichen Universität erhielt ich im November 1968 das Zeugnis über die wissenschaftliche Fachprüfung für das Lehramt an Gymnasien.

Am 1. März 1969 trat ich in die Dienste der Pharmazeutischen Werke Pfrimmer & Co., Erlangen und arbeitete im Auftrage dieser Firma im Stoffwechsel-Laboratorium der Chirurgischen Universitäts-Klinik in Gießen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Schultis. Vom 1. Januar 1970 bis 31. Dezember 1971 arbeitete ich im Biochemischen Labor der Firma in Erlangen.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990